

**ZUR PROBLEMATIK DER
BIOLOGISCHEN ACTH-BESTIMMUNG
IN VIVO UND IN VITRO**

Xaver Baur

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551923_0025

AUS DER II. MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROFESSOR DR. MED. E. BUCHBORN

ZUR PROBLEMATIK DER BIOLOGISCHEN ACTH-BESTIMMUNG
IN VIVO UND IN VITRO ⁺⁾

INAUGURAL - DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
VERFASST UND EINER HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER LUDWIG - MAXIMILIANS - UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON

XAVER BAUR

AUS

OBERROHR

1974

⁺⁾ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 51)

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr.med. P.C. Scriba
Mitberichterstatter:	Prof. Dr.med. E. Buchborn
Dekan:	Prof. Dr.med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.6.1975



Mein Dank gilt

Herrn Professor Dr. med. P.C. Scriba für die freundliche Überlassung des Themas und die Unterstützung, die er mir und dieser Arbeit gewährte,

Herrn Dr.med. O.A. Müller für seine unermüdliche Hilfe und Betreuung während der gesamten Versuche,

Fräulein R. Fröhlich für ihre ausgezeichnete Assistenz bei vielen Versuchen,

Herrn L. Bestler für die Anfertigung zahlreicher Zeichnungen und Fräulein F. Haag für das Ausführen der photographischen Arbeiten.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. <u>EINLEITUNG</u>	1
2. <u>ACTH-BIOASSAY IN VIVO</u> <u>(LIPSCOMB-NELSON-ASSAY)</u>	4
2.1. Prinzip	4
2.2. Material und Methode	4
2.2.1. Tiere, Chemikalien und Geräte	4
2.2.2. Hypophysektomie	5
2.2.2.1. Parapharyngeal	5
2.2.2.2. Transauricular	6
2.2.3. Katheterisierung und Versuchs- ablauf	8
2.2.4. Corticosteronbestimmung	9
2.3. Eichkurve und Vorversuche	10
2.4. Blutentnahme und Aufbewahrung des Serums bzw. Plasmas	11
3. <u>ACTH-BIOASSAY IN VITRO AN</u> <u>ISOLIERTEN NEBENNIERENZELLEN</u> <u>(IAC-ASSAY)</u>	13
3.1. Prinzip	13
3.2. Material und Methode	13
3.2.1. Tiere, Chemikalien und Geräte	13
3.2.2. Präparation der Nebennierenzellen und Inkubationsansatz	17
3.2.3. ACTH-Eichkurven und Berechnung unbekannter Proben	19
3.3. Vorversuche zur Optimierung der Methode	20
3.3.1. Rührgeschwindigkeit bei der Zell- präparation	20
3.3.2. Trypsinpräparate	21

3.3.3.	Einfluss der Konzentration an Proteasen-Inhibitoren auf die ACTH-Aktivität	22
3.3.3.1.	Erhöhung der LBI-Konzentration	22
3.3.3.2.	Trasylo ^R -Zusatz zu den ACTH- Lösungen	24
3.3.4.	2-Mercaptoäthanol als Störfaktor	27
3.3.5.	Untersuchungen mit verschiedenen Inkubationszeiten	28
3.3.5.1.	Eichkurven mit h-ACTH ₁₋₃₉ bei ver- schiedenen Inkubationszeiten	28
3.3.5.2.	Vergleich von ACTH ₁₋₂₃ , h-ACTH ₁₋₃₉ und Schweine-ACTH ₁₋₃₉ bei ver- schiedenen Inkubationszeiten	31
3.3.6.	Spezifität des IAC-Assays	34
3.3.7.	Volumen der zugesetzten ACTH- Lösung	36
3.3.8.	Schlussfolgerungen aus den Vorversuchen	37
4.	<u>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</u>	38
4.1.	Zur Richtigkeit der mit dem IAC-Assay gemessenen ACTH-Spiegel im Serum bzw. Plasma	38
4.1.1.	Messung der endogenen ACTH-Akti- vität in Seren von Normalpersonen	38
4.1.2.	Parallelität zwischen Standard- Eichkurve und Serum-ACTH in ver- schiedenen Verdünnungen	38
4.1.3.	Wiederfinderaten von exogenem ACTH im Serum bzw. Plasma	40
4.1.3.1.	Standard-Eichkurven im Normalplasma	40
4.1.3.2.	Einfluss von Serumvolumen, Höhe des endogenen ACTH-Spiegels und Aufbewahrungs- bzw. Inkubations- zeit	42
4.1.4.	Einfluss der Serumproteine und des pH-Wertes in der ACTH-Lösung	47

4.1.4.1.	ACTH-Standards mit verschiedenen Albumin-Konzentrationen und pH-Werten	47
4.1.4.2.	Hemmung der ACTH-Aktivität durch elektrophoretisch aufgetrennte Plasmaproteine	52
4.1.4.3.	Endogenes und exogenes ACTH im Serum bei verschiedenen pH-Werten	54
4.1.5.	Diskussion zur Richtigkeit der Serumbestimmungen im IAC-Assay	57
4.2.	Direkte Serumbestimmung	61
4.2.1.	Patienten mit Nelson-Syndrom (LN-Assay)	61
4.2.2.	Andere Patienten mit erhöhten ACTH-Spiegeln (LN-Assay)	65
4.2.3.	Vergleich der Ergebnisse von Serumbestimmungen im LN-Assay und im IAC-Assay	66
4.3.	ACTH-Extraktion aus dem Serum	69
4.3.1.	Gelfiltration	69
4.3.1.1.	Material und Methoden	69
4.3.1.1.1.	Verwendete Gele	69
4.3.1.1.2.	Elutionsmittel	70
4.3.1.1.3.	Säulen und Elutionstechnik	70
4.3.1.1.4.	Markieren und Reinigen von ACTH	71
4.3.1.1.5.	Gewinnung von ACTH-freiem Serum	72
4.3.1.1.6.	Proteinbestimmung	72
4.3.1.1.7.	Zählen der radioaktiven Proben	72
4.3.1.2.	Vorversuche	72
4.3.1.2.1.	Vergleich verschiedener Elutionsmittel	72
4.3.1.2.2.	Vergleich verschiedener Gele	74
4.3.1.2.3.	Rechromatographie	77

4.3.1.3.	Ergebnisse mit der Gelfiltration	79
4.3.1.3.1.	Wiederfindung von exogenem ACTH im Serum nach Gelfiltration	79
4.3.1.3.2.	Gelfiltration eines Serums mit hoher endogener ACTH-Aktivität	79
4.3.1.4.	Diskussion zur Gelfiltration	81
4.3.2.	Quiso-Extraktion	83
4.3.2.1.	Methode	83
4.3.2.2.	Ergebnisse und Diskussion	84
4.4.	Biologische ACTH-Aktivitäten in lipolytisch aktiven Hypophysen- fraktionen (Lipotropine)	88
4.4.1.	Extraktion und Reinigung der lipolytisch aktiven Hypophysen- fraktionen	89
4.4.2.	Bestimmung der lipolytischen Aktivität	89
4.4.3.	ACTH-Aktivitäten in den einzelnen Fraktionen	91
4.4.4.	Wiederfindequoten von exogenem ACTH in den Hypophysenfraktionen	91
4.4.5.	Diskussion zu den ACTH-Werten der Hypophysenfraktionen	94
5.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	97
6.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	101

Abkürzungsverzeichnis

$\varnothing$	= Durchmesser
$\bar{x}$	= Mittelwert
s	= Standardabweichung
$s_{\bar{x}}$	= Standardabweichung des Mittelwertes
KG	= Körpergewicht
Hx	= Hypophysektomiert
HSA	= Humanserumalbumin
BSA	= Serumalbumin vom Rind
FFS	= Freie Fettsäuren
EDTA	= Äthylendiamintetraessigsäure
KRB-Puffer	= Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer
LBI	= Lima Bean Trypsin Inhibitor
ACTH	= Adrenocorticotropes Hormon (falls erforderlich, ist die Aminosäuresequenz als Fussnote angefügt)
h-ACTH	= Adrenocorticotropes Hormon des Menschen
$^{125}\text{J-ACTH}$	= Mit ^{125}J markiertes ACTH
LN-Assay	= ACTH-Bioassay in vivo nach Lipscomb und Nelson
IAC-Assay	= ACTH-Bioassay in vitro mit isolierten Nebennierenzellen nach Sayers (IAC = Isolated Adrenal Cells)
RIA	= Radioimmunoassay

1. EINLEITUNG

Für nahezu alle Hormone wurden in den letzten Jahren hochempfindliche Bestimmungsmethoden, zumeist Radioimmunoassays, entwickelt; so prinzipiell auch für das ACTH (100, 6). Doch erwies sich die Messung gerade dieses Hormons als besonders schwierig. Die Gründe hierfür sind z.T. bekannt. z.T. sicher noch nicht ausreichend geklärt. So ist die bisher ermittelte physiologische Konzentration von 10 bis 50 pg/ml Plasma extrem niedrig (82, 96). Ausserdem sind von mehreren Autoren Störfaktoren im Plasma beschrieben worden (15, 69, 88).

Verschiedene Extraktions- und Anreicherungsverfahren zur Umgehung dieser Schwierigkeiten erbrachten für eine genaue quantitative Bestimmung zumeist unbefriedigende Ergebnisse, u.a. Versuche mit Säure/Aceton bzw. Oxycellulose (11, 51, 67, 84), Amberlite (31, 93), Gelfiltration (99), Spezialglas (62), Cuso G 32 (mikrofeine präzipitierte Silikat-Granula) und Talkum (15, 24, 56, 64, 69). Ein weiteres Problem stellt die starke Wandadsorption des ACTH an Glas- und Plastikwaren dar (3, 96).

In zahlreichen Radioimmunoassays erwies sich neben dem Inkubationsdamage als ein weiteres besonderes Hindernis, dass ACTH-Fragmente und andere biologisch inaktive Substanzen mitreagieren und dass sich deswegen - je nach Antikörper - unterschiedliche Werte ergeben (5, 16, 23, 30, 46, 55).

Daraus ergibt sich die Forderung, dass die Qualität jedes neuen Assays zuerst an einer zuverlässigen Bestimmungsmethode (Referenzmethode) getestet werden muss.

Die einzigen Methoden, die bisher spezifisch das biologisch wirksame ACTH messen, sind die ACTH-Bioassays. Es haben sich die drei folgenden durchgesetzt:

a) Der klassische Sayers-Test: Messung des Ascorbinsäureschwundes in der Nebenniere der hypophysectomierten Ratte nach ACTH-Applikation (71). Mit dieser Methode war erstmals eine

Standardisierung von ACTH-Präparaten möglich. Es handelt sich um einen relativ ungenauen und unempfindlichen Assay (Schwellendosis ca. 2 ng).

b) Der Lipscomb-Nelson-Assay mit seinen zahlreichen Variationen: Messung des Corticosteronanstiegs in vivo im Nebennierenvenenblut der akut hypophysektomierten Ratte nach Verabreichung von ACTH (25, 41, 53, 54, 58, 76). Diese Methode ist empfindlicher (je nach Autor 0,1 bis 0,5 ng), jedoch mit grossem Arbeitsaufwand und einer immer noch relativ starken Streuung der Einzelwerte verbunden.

c) Der von SAYERS et al. entwickelte IAC-Assay: Messung der Corticosteronproduktion in vitro an isolierten Nebennierenzellen nach ACTH-Gabe. Dieser Assay zeichnet sich durch gute Reproduzierbarkeit, hohe Empfindlichkeit und nicht zuletzt durch seine relative Einfachheit und grosse Kapazität gegenüber anderen Bioassays aus (68).

Daneben gibt es seit kurzem noch den von CHAYEN et al. entwickelten Redox-Bioassay, eine äusserst empfindliche, aber technisch aufwendige und arbeitsintensive Methode (9, 10, 28).

Auch der u.a. von LEFKOWITZ et al. (37) und WOLFSEN et al. (94) publizierte Radiorezeptor-Assay ist sehr aufwendig. Insbesondere bereitet die Präparation des Rezeptors und die Reproduzierbarkeit der Methode noch erhebliche Schwierigkeiten (persönliche Mitteilung von W.D.ODELL).

In unserer Arbeitsgruppe wird seit 1966 mit mehreren Modifikationen des Lipscomb-Nelson-Assays gearbeitet (27, 34, 48, 49, 60). Ziel dieser Arbeit war der Aufbau des weniger aufwendigen und dafür genaueren und empfindlicheren IAC-Assays. Dadurch sollte versucht werden, eventuell eine bessere Möglichkeit für die Bestimmung auch relativ niedriger ACTH-Spiegel im Serum (z.B. Normalpersonen) und in Hypophysenextrakten zu erhalten. Auch sollten die Probleme dieser Methode mit denen des LN-Assays,

z.B. anhand von Parallelmessungen mit beiden Methoden bei Patienten mit Nelson-Syndrom, verglichen werden. Zusätzlich soll dieser relativ einfache IAC-Bioassay später als Referenzmethode für eine bei uns noch aufzubauende radioimmunologische Bestimmungsmethode dienen. Ausserdem sollte unter Einsatz dieses Assays in eigenen Untersuchungen zur Frage der Störfaktoren im Serum und zum Problem der Extraktion von ACTH aus dem Serum, z.B. durch Quso G 32 und Säulenchromatographie, Stellung genommen werden.

2. ACTH-BIOASSAY IN VIVO (LIPSCOME-NELSON-ASSAY)

2.1. Prinzip.

Die Nebennieren der akut hypophysektomierten Ratte produzieren eine der - bei uns intraaortal - applizierten ACTH-Konzentration proportionale Corticosteron-Menge. Zur Messung der Corticosteron-Menge wird Venenblut der linken Nebenniere über einen in der linken Vena suprarenalis liegenden Katheter gesammelt.

2.2. Material und Methode.

2.2.1. Tiere, Chemikalien und Geräte.

Tiere: Männliche Ratten, Stamm BR 46-Wistar II, Gewicht 190 - 300 g, Fa. Brünge, Bockel/Bielefeld.

Chemikalien und Lösungsmittel:

ACTH: Synthetisches Corticotropin (β 1 - 23) - trikosipeptidamid Acethropan^R - S, Fa. Hoechst, Frankfurt

ACTH-Lösungsmittel: 0,9% NaCl-0,001 N HCl

Amylenhydrat, Fa. Schuchardt, München

Avertin^R (2,2,2 Tribromäthanol), Fa. Fluka, Buchs/Schweiz; es wurde eine 100%ige Stammlösung von 2,2,2 Tribromäthanol in Amylenhydrat hergestellt und daraus täglich eine 2,5%ige Konzentration mit Aqua dest. frisch angesetzt.

Urethan^R, Fa. Merck, Darmstadt. Täglich wurde eine frische 10%ige Lösung mit Aqua dest. angesetzt.

Corticosteron (4-Pregnen-11 β , 21-diol-3,20-dion), Fa. Fluka, Buchs/Schweiz

Vetren^R (200 I.E. Heparin/2 ml), Fa. Promonta, Hamburg
Äthanol abs., reinst, Fa. Merck, Darmstadt

Dichlormethan, "Rothitainer", Fa. Roth, Karlsruhe

Natronlauge 0,1 N, Apotheckenherstellung.

Geräte: Binokularmikroskop mit Lupenvergrößerung,
10fach, Fa. Leitz, Wetzlar

Perfusor mit 10 ml Rekordspritze, Fa. Braun,
Melsungen. Eingestellt auf Stufe 8, d.h. in
95 sec. wird 1 ml infundiert

Einmalkanülen Nr. 14 (0,65 x 32 mm), Fa. Braun,
Melsungen

Arterielle Katheter, Grösse OR, mit internatio-
nalem Spitzenansatzstück, Fa. Braun, Melsungen

Venenkatheter, Ø aussen 0,9 mm, Ø innen 0,69 mm,
Fa. Vogel, Giessen

Wasserstrahlpumpe mit Woulff'scher Flasche und
gebogener Glaskanüle, Ø ca. 1 mm an der Spitze

Spektralfluorometer mit zwei Monochromatoren und
Xenon-Hochdrucklampe, Fa. Beckman Instruments GmbH,
München

Mikroabsaugküvette nach Gerb (21), Fa. Hellma,
Mühlheim/Baden

Lange Schliffgläser 20 ml, graduiert, mit Stopfen,
Ø 1,5 x 20 cm

Kurze Schliffgläser 20 ml, mit Stopfen, Ø 2,5 x 9 cm

Tropftrichter 500 ml mit Druckausgleichsrohr,
Schliff passend auf einen 1 l-Erlmeyerkolben

Glasbecken 30 x 60 x 40 cm

Magnetrührer mit Teflonrührstab

Whirlmix, Vortex Genie, Fa. Scientific Instruments Inc.,
Springfield/Mass.

Rotationsmischer, Spezialanfertigung, Fa. Gruhnwald,
München.

2.2.2. Hypophysektomie.

2.2.2.1. Parapharyngeal.

Narkose: Pro 100 g KG 0,8 ml 2,5%ige Avertinlösung intraperitoneal.

Nach Hautschnitt und stumpfer Freipräparation der Schädelbasis wird diese mittels eines Zahnbohrers eröffnet, die Dura mater aufgeschlitzt und mit einer gebogenen Glaskanüle, die an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen ist, die Hypophyse abgesaugt (Einzelheiten bei 18, 27, 60).

2.2.2.2. Transauriculär.

Im weiteren Verlauf der Versuche wandten wir dieses wesentlich einfachere Vorgehen an (2, 19).

Verwendet wurde ein Meerschweinchen-Operationstisch (Firma Braun, Melsungen) mit einer Vorrichtung zum Fixieren des Rattenkopfes. Diese bestand aus folgenden Teilen (Abb.1):

1. Zwei 6 mm dicken Messingstiften, die vorne eine Spitze (Winkel zur Längsachse 30°) sowie einen Bohrkanal (20° zur Längsachse) besitzen. Der Kanal verläuft von einer Einkerbung ca. 1 cm von der Spitze des Stiftes entfernt bis direkt zur Spitze.

2. Haltevorrichtung am Operationstisch für die Stifte: Zwei kubische Messingstücke mit einem Loch ($\varnothing = 6,2$ mm) und Feststellschraube.

Ausserdem wurden Injektionsnadeln aus nichtrostendem V2A-Stahl verwendet ($\varnothing = 1,1$ mm), die in den Bohrkanal der Messingstifte passen. Die Nadelspitzen waren in einem Winkel von 45° zur Längsachse abgeschliffen. In Äthernarkose wird der Ratte beiderseits basal die Ohrmuschel eingeschnitten und der Kopf mit den beiden Stiften, die in den äusseren Gehörgang kommen, fixiert. Die Stifte werden dabei mittels einer Markierung in ihrer horizontalen Ebene und einer Winkelmarkierung an der Halterung durch eine Drehung um ca. 10° so eingestellt, dass die Nadel durch den Bohrkanal von hinten unten aussen nach vorn oben medial geführt wird. Die Injektionsnadel, die sich auf einer z.T. mit Wasser gefüllten 10 ml Rekordspritze befindet, wird dabei unter Drehbewegungen durch die Weichteile und den Schädelknochen bis in die Hypophyse langsam vorangetrieben. Ein starrer Teflonschlauch - als Manschette auf der Nadel - verhindert ein zu weites Vorstossen (Distanz äusseres Bohrloch - Hypophyse: 15 - 16 mm).

Nun wird durch Zug an der Spritze ein Unterdruck erzeugt und die Hypophyse dadurch abgesaugt.

Nach einiger Übung lässt sich aus der erhaltenen Gewebsmenge recht zuverlässig die Vollständigkeit der Hypophysektomie beurteilen.

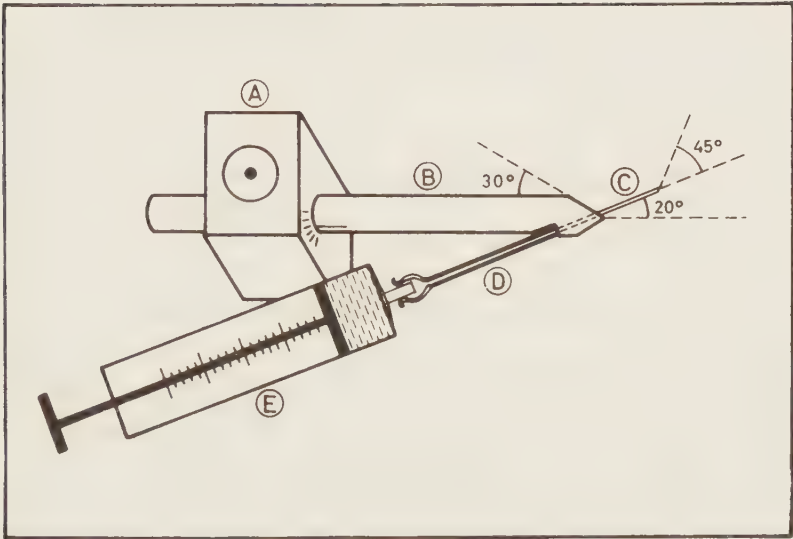


Abb. 1: Vorrichtung zur transauriculären Hypophysektomie der Ratte: Messingstift mit Bohrkanal und Einkerbung (B) sowie Haltevorrichtung zur Fixierung auf dem Op.-Tisch (A), Nadel (C) mit Manschette (D) und Spritze (E).

Notfalls kann nochmals von der gleichen oder der gegenüberliegenden Seite vorgegangen werden.

Diese Art der Hypophysektomie stellt eine erhebliche Arbeitsersparnis dar; sie ist sehr schnell durchführbar und erfordert weniger Geschicklichkeit als die parapharyngeale Methode. Die Hauptschwierigkeit ist das exakte Einstellen des Schädels. Ein nicht genau fixierter Schädel hat als Komplikationen z.B. Gehirnverletzungen und starke Blutungen zur Folge.

Kriterien für eine vollständige Hypophysektomie waren:

1. Keine Hypophysenreste bei der Inspektion der Sella am Versuchsende. Hierzu wird das Schädeldach eröffnet

und das Gehirn entfernt.

2. Niedrige Corticosteron-Basiswerte: Der Corticosterongehalt des Rattenblutes fällt nach erfolgreicher Hypophysektomie kontinuierlich ab und erreicht nach etwa 70 min. einen Basiswert, der nicht mehr weiter unterschritten wird (27).

Beide Kriterien mussten für einen gültigen Versuch erfüllt sein (48).

2.2.3. Katheterisierung und Versuchsablauf.

Der erneut narkotisierten Ratte (pro 100 g KG 0,9 ml 10%ige Urethanlösung s.c. und 0,3 ml 2,5%ige Avertinlösung intraperitoneal) wird ein Katheter über die Arteria femoralis in die Aorta bis in Höhe des Zwerchfells vorgeschoben. Das Tier erhält jetzt 50 I.E. Heparin pro 100 g KG. Der Venenkatheter wird über die Vena femoralis in die Vena Cava inf. vorgeschoben und nach Laparatomie unter Sicht über die Vena renalis in die Vena suprarenalis sinistra eingeführt, so dass also direkt Nebennierenvenenblut gesammelt werden kann (Einzelheiten siehe bei HACKER (27), SCRIBA et al. (76) und PISTER (60).

Über den arteriellen Katheter wird mit einem Perfusor jeweils 1 ml ACTH-Standard oder unbekannte Probe bzw. NaCl-Lösung intraaortal infundiert. Das Blut der linken Nebennierenvene wird in Hämatokritröhrchen gesammelt, zentrifugiert und das Plasma bei -15°C bis zur endgültigen Corticosteronbestimmung eingefroren. Der genaue zeitliche Ablauf ist der Tab. 1 zu entnehmen. VERNIKOS-DANELIS (87) stellte in der Zeit zwischen 2 und 4 Stunden nach Hypophysektomie die grösste Empfindlichkeit der Nebennieren auf ACTH fest.

Diese Zeitspanne wurde in allen unserer Versuche eingehalten.

Tab. 1: Schematische Darstellung der Infusions- und Blutentnahmezeiten in Anlehnung an PISTER (60).

Lfd. Zeit (min)	Vorgang	Zeitdauer des Vorgangs (min)
00.00	1. Infusion (NaCl-Lösung)	1.35
01.35	Wartezeit	1.25
03.00	1. Blutentnahme (Corticosteron-Basiswert)	8.00
11.00	2. Infusion (0,22 bzw. 0,36 ng ACTH als Testsubstanz)	1.35
12.35	Wartezeit	1.25
14.00	2. Blutentnahme (Anstieg auf Testdosis)	8.00
22.00	Pause	8.00
30.00	3. Infusion (NaCl-Lösung)	1.35
31.35	Wartezeit	1.25
33.00	3. Blutentnahme (Corticosteron-Basiswert)	8.00
41.00	4. Infusion (die zu messenden Lösungen)	1.35
42.35	Wartezeit	1.25
44.00	4. Blutentnahme (Anstieg auf zu messende Lösung)	8.00

2.2.4. Corticosteronbestimmung.

Corticosteron wurde fluorometrisch mit Hilfe eines Beckman-Spektralfluorometers (2 Monochromatoren: Absorption = 464 nm bei einer Spaltbreite von 20 nm; Emission = 522 nm bei einer Spaltbreite von 5 nm) mit der von PISTER (60) für das Corticosteron modifizierten Cortisolmethode nach GERB (21) bestimmt: Die Extraktion der Proben erfolgt mit 10 ml Dichlormethan auf einem Rotationsmischer; danach wird der (Plasma-) Überstand verworfen und mit 1 ml 0,1 N NaOH gewaschen. Das extrahierte

Corticosteron wird nun mit 4,25 ml Fluoreszenzreagenz (Äthanol abs. und konz. H_2SO_4 im v/v-Verhältnis 3 : 7) auf einem Whirlmix gemischt. 80 min. später wird dann die Dichlormethanphase abgesaugt und die Fluoreszenzintensität gemessen.

2.3. Eichkurve und Vorversuche.

PISTER (60) hatte eine lineare Beziehung zwischen applizierter ACTH-Menge und Corticosteronanstieg gefunden.

Es war anzunehmen, dass diese Beziehung auch für unsere Versuche galt, da genau dieselben Bedingungen eingehalten wurden (gleicher Tierstamm, gleiche Narkose, Operationstechnik, Blutentnahmezeiten etc.). Das bestätigte sich auch weitgehend, wie eigene Untersuchungen ergaben (Tab.2).

Tab. 2: Vergleich der PISTER'schen ACTH-Eichkurve mit den eigenen Kontrollmessungen.

ACTH-Dosis ng	PISTER'sche Werte		Eigene Ergebnisse	
	Corticosteron- anstieg $\mu g/8$ min. $\bar{x} \pm s$	N	Corticosteron- anstieg $\mu g/8$ min. $\bar{x} \pm s$	N
0,0	-0,0002 $\pm$ 0,0025	7	-0,0005 $\pm$ 0,0071	40
0,05	0,0037 $\pm$ 0,0032	15	-	
0,1	0,0095 $\pm$ 0,0014	8	-	
0,22	0,019 $\pm$ 0,0081	24	0,0080 $\pm$ 0,0080	23
0,36	-		0,0275 $\pm$ 0,0152	42
0,46	0,043 $\pm$ 0,01	15	0,0412 $\pm$ 0,0157	14
1,0	0,085 $\pm$ 0,0087	10	0,080 $\pm$ 0,0047	3
2,0	-		0,159 $\pm$ 0,0060	3
4,6	0,443 $\pm$ 0,062	8	-	
10,0	-		1,482 $\pm$ 0,1100	2
22,0	2,190 $\pm$ 0,109	8	-	

Die 0,22 ng Werte lagen allerdings etwas niedriger (geringere Empfindlichkeit?), die 10 ng Werte höher. Aus diesen Unterschieden sind aber wegen den sowieso recht grossen Schwankungen der Einzelwerte in diesem Bio-Assay sicher keine weitreichenden Schlüsse zu ziehen. Auffallend waren die höheren Standardabweichungen als bei PISTER, wenn sie auch deutlich unter den früher angegebenen lagen (27,34).

Dass wir - trotz dieser Abweichungen - die PISTER'sche Eichkurve zum Ablesen von unbekannten ACTH-Werten heranzogen, lag an dem zu grossen Arbeitsaufwand für das Erstellen einer eigenen Eichkurve. Die recht hohe Zahl der eigenen "Eichwerte" resultiert zum grössten Teil aus den bei anderen Untersuchungen (s.z.B. 4.2. und 4.4.) mitgemessenen ACTH-Testdosen. Es besteht nach den Untersuchungen von PISTER (60) kein signifikanter Unterschied für den Corticosteronanstieg an derselben Ratte auf mehrere gleiche ACTH-Dosen, z.B. 0,22 ng ACTH eingesetzt als zweite Infusion (Testdosis) bzw. als vierte Infusion (Tab. 1).

Die Problematik des Lipscomb-Nelson-Assays liegt also im zu hohen Arbeitsaufwand, der geringen Empfindlichkeit und der relativen Ungenauigkeit.

2.4. Blutabnahme und Aufbewahrung des Serums bzw. Plasmas.

Wegen der äusserst schnellen Inaktivierung von ACTH im Plasma (5, 45, 47, 59, 65) - die Halbwertszeit wird bei 37°C in vitro, d.h. im Reagenzglas, mit 1 - 2 Stunden angegeben - müssen besondere Vorkehrungen getroffen werden: Die Blutabnahme erfolgte bei den Patienten - sofern nicht anders angegeben - um 9.00 Uhr morgens (Tagesrhythmik!) aus der Vena cubitalis. Das Blut wurde in Plastikröhrchen gesammelt, die im Eisbad gekühlt waren. In der Regel fügten wir 400 KIE Trasylol^R pro ml Blut hinzu und zentrifugierten dann bei 4°C 10 min. lang mit

3000 U/min. Nach Dekantieren des Serums in Eppendorf-Röhrchen (Aliquots von 0,5 bzw. 1,2 ml) wurden diese bei -80° C eingefroren. In späteren Versuchen, insbesondere beim IAC-Assay (siehe Kap. 3.3. und 3.4.), wurden zusätzlich 1 mg EDTA bzw. 15 μ l Vetren^R pro ml Blut zugegeben. Beide Substanzen hatten - nach eigenen Vorversuchen - bei diesen Mengen keinen störenden Einfluss auf den IAC-Assay, obwohl eventuell durch das EDTA die optimale Kalziumkonzentration (68) nicht mehr gewährleistet war. Bei Ratten erfolgte die Blutabnahme in Äthernarkose mittels eines Katheters aus der Arteria femoralis. Die weitere Verarbeitung erfolgte in der gleichen - oben angegebenen - Weise.

Bei den folgenden Versuchen wird meist nicht streng zwischen Serum und Plasma unterschieden, da sich in keinem der Versuche irgendwelche Unterschiede ergaben; auch sind uns aus der Literatur keine Diskrepanzen bekannt.

3. ACTH-BIOASSAY IN VITRO AN ISOLIERTEN
NEBENNIERENZELLEN (IAC-ASSAY) +)

3.1. Prinzip.

Durch eine kombinierte (tryptische und mechanische) Behandlung wird aus Rattennebnieren eine Zellsuspension hergestellt. Diese Zellsuspension produziert bei Inkubation eine von der zugefügten ACTH-Konzentration abhängige Corticosteronmenge. Corticosteron wird nach Beendigung der Inkubation aus der Zellsuspension extrahiert und fluorometrisch bestimmt.

3.2. Material und Methode.

3.2.1. Tiere, Chemikalien und Geräte.

Tiere: Männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht von 300 - 370 g, Fa. Bäumler, Wolfratshausen. Die Tiere wurden bei 24°C gehalten, Futter und Wasser standen ad libidum zur Verfügung.

Chemikalien:

Albumin vom Rind, reinst (BSA), Fa. Behring, Marburg/Lahn
Albumin vom Menschen (HSA), Cea-Cen, Fa. Sorin/Italien
Heparin, Vetren^R, 200 I.E./2 ml, Fa. Promonta, Hamburg
Lima Bean Trypsin Inhibitor (LBI), Fa. P-L Biochemical, Inc. und Fa. Worthington Biochem. Corp.
2-Mercaptoäthanol, Fa. Merck, Darmstadt
D(+)-Glucose wasserfrei, Fa. Merck, Darmstadt
Trasylol^R, 100 000 KIE/10 ml, Fa. Bayer, Leverkusen
Trypsin (vom Rind), krist. lyophilisiert, 2,0 U/mg Fa. Merck, Darmstadt, und lyophilisiert, 194 U/mg (TRL) Fa. Worthington Biochem. Corp.

+) Wir möchten an dieser Stelle Herrn Dr. H.L. Fehm und Herrn Dr. R. E. Lang (SFB 87, Ulm) sehr herzlich für ihre Ratschläge beim Aufbau dieses Bioassays danken.

- ACTH: 1. Cortocotropin-(8,1-23)-Trikosipeptidamid, Acethropan^R-S, synth. (ACTH₁₋₂₃), Fa. Hoechst, Frankfurt
2. h-ACTH₁₋₃₉, human, synth., Fa. Ciba, Basel
3. Schweine-ACTH₁₋₃₉, aus Hypophysen isoliert, Dr. Aaron B. Lerner +)

ACTH-Lösungsmittel: Die Standards wurden - soweit nicht anders angegeben - in 0,9%iger NaCl-Lösung mit 0,5% BSA und pH 3,5 verdünnt. Vergleichsuntersuchungen wurden mit 0 bis 4% BSA bzw. HSA und pH-Werten zwischen 0,95 und 7,12 durchgeführt. Die pH-Justierung erfolgte bis 1% Albumin mit 0,1 N HCl, bei 4% Albumin mit 0,5 N HCl.

Die Standards wurden jeweils am Tag vor dem Versuch in die Inkubationsgefäße pipettiert und bei -80° C bzw. in einigen Versuchen bei -15° C aufbewahrt. Es wurden, soweit nicht ausdrücklich anders vermerkt, 100 µl Standard pro Probe verwendet. Serum wurde z.T. weniger eingesetzt, die Differenz zu 100 µl wurde dann jeweils durch das entsprechende ACTH-Lösungsmittel ausgeglichen.

Salzlösung A enthielt pro Liter: 1 200 mMol NaCl, 47 mMol KCl, 25 mMol CaCl₂ x 2 H₂O, 12 mMol MgSO₄ x 7 H₂O. Diese Lösung wurde bei + 4° C aufbewahrt und bis zu 3 Wochen lang verwendet.

Salzlösung B enthielt pro Liter: 14,7 mMol KH₂PO₄, 250 mMol NaHCO₃. Lösung B wurde jeweils unmittelbar vor Versuchsbeginn neu angesetzt.

Der Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer (KRB) wurde hergestellt aus 1/10 Volumen Salzlösung A, 1/10 Volumen Salzlösung B und 8/10 Volumen Aqua dest., wobei der pH-Wert dieser Lösung (ca. 7,4) während der Inkubation unter Carbogenbegasung eingestellt wird (s. Kap. 3.2.3.).

KRB-Trypsin-Puffer enthielt zusätzlich 0,25 g% Trypsin und 0,2 g% Glukose.

KRB-LBI-Puffer enthielt zusätzlich 0,1 g% LBI, 0,2 g% Glukose, 0,5 g% BSA und 5,15 mMol CaCl₂, so dass die gesamte CaCl₂-Konzentration 7,65 mMol betrug. In einigen Vergleichsuntersuchungen wurde die LBI-Konzentration bis auf 0,3% erhöht.

Siliconlösung, Fa. Serva, Heidelberg, zum Siliconisieren der Glasgefäße und Arbeitsgeräte.

+) Wir möchten Herrn Dr. A.B. Lerner an dieser Stelle sehr herzlich für die freundliche Überlassung seiner ACTH-Präparation danken. Ebenso danken wir der Fa. CIBA und der Fa. HOECHST für die Überlassung ihrer synth. ACTH-Präparate.

Glaswaren und Arbeitsgeräte:

Alle mit den Zellen in Berührung kommenden Gefässe und Arbeitsgeräte mit Ausnahme der Eppendorf-Pipettenspitzen bestanden aus Glas. Sie wurden vor jedem Versuch - wie von SAYERS (68) angegeben - siliconisiert, um die Adsorption von ACTH an Glas zu vermindern (3). Im Einzelnen wurden pro Versuch verwendet:

- 64 Inkubationsgläser mit Schliff 20 ml, $\varnothing$ 2,4 cm x 9,5 cm
- 1 Erlmeyerkolben 50 ml (Rührgefäss)
- 1 Erlmeyerkolben 100 ml
- 1 Erlmeyerkolben 250 ml
- 2 Zentrifugengläser 50 ml
- 1 Glaspaddel nach der Vorschrift von SAYERS (68), siehe Abb. 2
- 1 Packard-Zählgläschen 20 ml
- 1 Vollpipette 25 ml (Glas)

Das Pipettieren von Standard, Serum und Zellsuspension in die Inkubationsgefässe erfolgte mit Eppendorf-Pipetten.

Kühlzentrifuge Rotixa/K mit Rotor 6256, Fa. Hettich, Tuttlingen.

Wasserbad mit Thermostat (zur Präparation)

Rührer RZ R 1 stufenlos verstellbar zwischen 35-250 und 280-2200 U/min., Fa. Heidolph, Kelheim

Köttermann-Wasserbad mit Thermostat und Schüttteleinrichtung, stufenlos verstellbar, eingestellt auf 65-68 Bewegungen pro Minute (zur Inkubation), Fa. Köttermann, Hänigsen

In das Köttermann-Wasserbad eingepasster Einsatz für die Inkubationsgefässe, Spezialanfertigung.

Belüftungssystem: Eine Carbogen-Gasflasche (95% O₂, 5% CO₂) ist über einen Schlauch verbunden mit einem Aquarium-Belüftungsstein, der sich in einem mit Aqua dest. zu 3/4 gefüllten und mit einem Gummistopfen verschlossenen 500 ml Erlmeyerkolben befindet. Dieses Gefäss steht ebenfalls im Präparationswasserbad (37°C), siehe Abb. 2. Von hier aus wird der Luftstrom in das Rührgefäss (Präparation) bzw. über einen Verteiler mit 64 Schläuchen ($\varnothing$ = 0,5 cm), an deren Ende sich jeweils ein Siliconstopfen mit 2 Einmal-Blutabnahmekanülen ($\varnothing$ = 1,1 x 30 mm, Fa. Braun, Melsungen) befindet, in jedes einzelne Inkubationsglas geleitet (Inkubation), siehe Abb. 2.

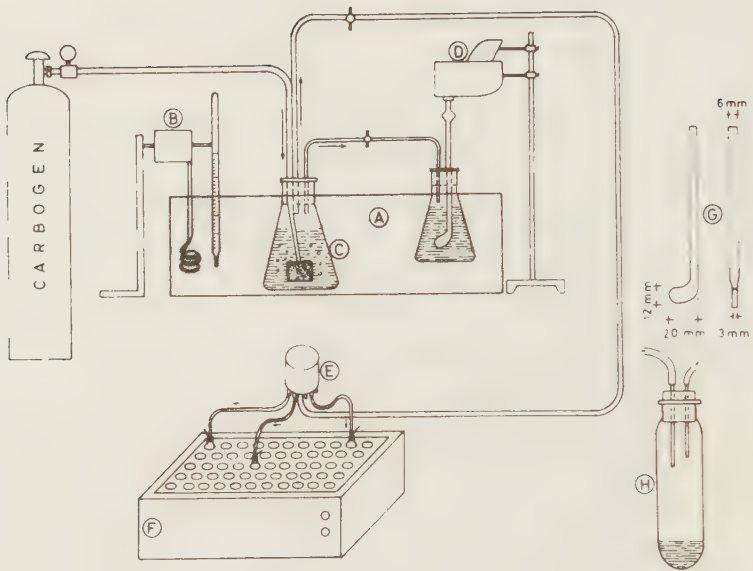


Abb. 2: Schematische Darstellung der Apparatur zur Zellpräparation und Inkubation. Erklärung im Text.

- A Wasserbad zur Präparation (37° C)
- B Thermostat
- C Carbogenanfeuchtung und -erwärmung
- D Rührer mit Paddel und 50 ml-Erlmeyerkolben
- E Gasverteiler
- F Köttermann-Wasserbad mit Einsatz und einigen Inkubationsgläsern
- G Glaspaddel nach SAYERS (68)
- H Inkubationsglas mit Siliconstopfen und 2 Nadeln sowie Inkubationsgemisch

3.2.3. Präparation der Nebennierenzellen
und Inkubationsansatz.

Präparation: Wir übernahmen die von SWALLOW und SAYERS 1971 (68) beschriebene Methode mit geringfügigen Änderungen. 16 Sprague-Dawley Ratten werden in Äthernarkose laparotomiert, durch Läsion der Aorta abdominalis entblutet und beide Nebennieren durch je einen Scherenschnitt mit dem umgebenden Fettgewebe rasch entfernt. Dann werden die Nebennieren vom Fett und ihrer Kapsel befreit, in je 4 bis 5 etwa gleich grosse Teile zerschnitten, in ein mit eisgekühltem KRB-Puffer gefülltes 20 ml Gläschen eingebracht und unter geringer kontinuierlicher Carbogenbegasung aufbewahrt, bis alle Nebennieren auf diese Weise präpariert sind. Dann werden die Nebennieren-Teilchen in einen 50 ml Erlmeyer-Kolben gegeben und unter etwas stärkerer Begasung mit einem Rührer (500 U/min.), an dem der speziell angefertigte Glaspaddel (s.o. bzw. Abb.2) angebracht ist, bei 37°C 5 x 20 min. lang gerührt. Der Paddel befindet sich ca. 1 mm über dem Boden des Erlmeyerkolbens. Nach 20 min. wird jeweils der Rührer gestoppt. Wenn sich die größeren Teile abgesetzt haben, wird mittels einer 25 ml Vollpipette der Überstand, der die bereits jetzt isolierten Zellen enthält, in einen eisgekühlten 250 ml Erlmeyer-Kolben eingebracht. Zu den Nebennieren-Fragmenten kommen wieder 20 ml KRB-Trypsin-Puffer, dann beginnt der Rührvorgang von neuem. Es handelt sich also um eine mechanische und zugleich tryptische Zerkleinerung. Die auf diese Weise gewonnene Zellsuspension von ca. 100 ml wird in der Kühlzentrifuge (4°C) in 10 min. langsam auf 100 g beschleunigt und so 30 min. lang zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich zahlreiche Membran- und Zell-Bruchstücke befinden, wird verworfen und das rötlich-braune Sediment, die Nebennieren-Zellen mit Verunreinigungen, in 60 ml KRB-LBI-Puffer resuspendiert;

d.h. das eventuell noch im Sediment vorhandene Trypsin wird durch den LBI neutralisiert. Einzelne grössere Nebennieren-Teilchen werden durch Filtration oder mit einer Pipette entfernt.

Mit dieser Präparation erhielten wir eine Zellzahl zwischen 70 000 und 120 000 Zellen pro ml KRB-LBI-Puffer. Gezählt wurde im Lichtmikroskop mit der Neubauer-Zählkammer in Verdünnungen 1:10 mit verdünnter Essigsäure bzw. Methylenblau.

Zur Charakterisierung unseres Zellmaterials fertigten wir zahlreiche Ausstriche an und färbten sie nach Giemsa. Die Zellen lagen überwiegend einzeln vor; es zeigten sich aber auch manchmal kleinere Zellverbände. Z.T. wiesen die Zellen grössere Beschädigungen auf, besonders ausgeprägt bei erhöhter Rührgeschwindigkeit. KITABCHI (33) fand, bei etwas anderem Rührsystem, in elektronenmikroskopischen Untersuchungen 90% Zellen aus der Zona fasciculata, weniger als 5% aus der Zona glomerulosa und praktisch keine aus dem Nebennierenmark.

Inkubation:

Je 900 μ l Zellsuspension werden in die Inkubationsgefässe mit den pipettierten Standards bzw. Seren gegeben. Um eine möglichst gleichmässige Verteilung der Zellen zu erreichen, wird die Zellsuspension beim Pipettieren ständig geschüttelt.

Bei Serumproben wird durch Zusatz von 5 μ l Vetren^R ein Verklumpen und Gelieren der Zellen verhindert. 5 μ l Vetren^R/Probe zeigten keinen störenden Einfluss auf den Assay. Nun werden die Inkubationsgefässe in den Einsatz des Köttermann-Wasserbades eingebracht, mit den Siliconstopfen des Belüftungssystems verschlossen und im Wasserbad bei 37°C 2 Stunden lang - soweit nicht anders angegeben - unter 65 - 68 Schüttelbewegungen pro Minute inkubiert. Nach einer etwas stärkeren Belüftung in den ersten Minuten wird dann nur noch alle 5 - 8 min. einmal kurz begast. Die fluorometrische Corticosteron-Bestimmung (s.Kap.2.2.4.) wird entweder sofort nach der Inkubation durchgeführt oder die Proben werden bis zur Bestimmung bei -15°C eingefroren.

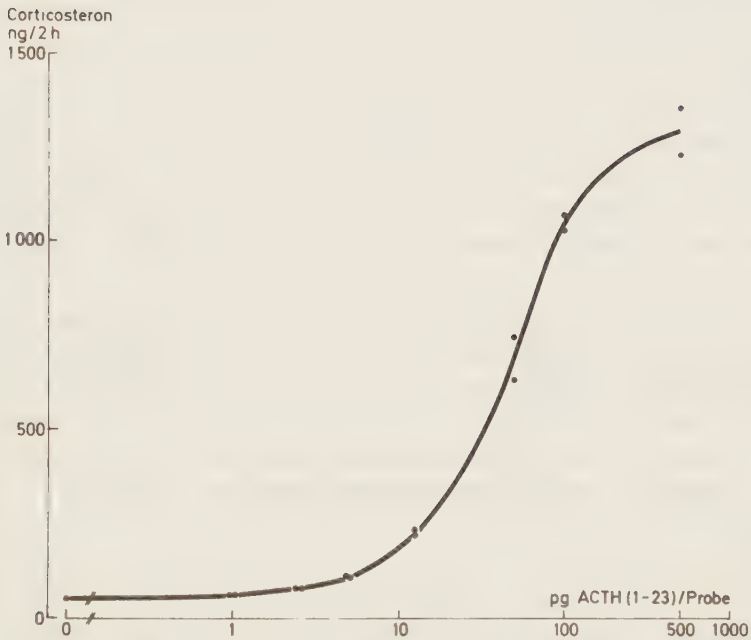


Abb. 3: ACTH-Standard-Eichkurve im IAC-Assay.
Inkubationszeit: 2 h.

3.2.4. ACTH-Eichkurven und Berechnung unbekannter Proben.

Die Abb. 3 zeigt eine typische Eichkurve des IAC-Assays im halb-logarithmischen Maßstab.

Zeichnet man die Eichkurve in linearem Maßstab, so ergibt sich bis 50 pg ACTH (in einigen Versuchen bis 100 pg) stets eine lineare Beziehung zwischen Corticosteronanstieg und der ACTH-Konzentration. Bei höheren Konzentrationen flachte die Kurve ab.

ACTH-Mengen von ≥ 1000 pg konnten überhaupt nicht mehr voneinander unterschieden werden. Die untere Nachweisgrenze beträgt, etwas schwankend von Versuch zu Versuch, 1 bis 2,5 pg ACTH pro Probe.

Die Proben unbekannter Konzentration wurden an der Eichkurve abgelesen. Da die Form der Eichkurven praktisch der Sigma-Form der bei RIAs erhaltenen Eichkurven glich, konnte die hierfür entwickelte Computer-Auswertung mittels Spline-Approximation mit Hilfe einer EDV-Anlage ebenfalls für die Auswertung eingesetzt werden (44).

Wie die Abb. 3 - bestätigt durch zahlreiche weitere Versuche - zeigt, ergaben Mehrfachmessungen eine für einen Bio-Assay ausgezeichnete Übereinstimmung der Einzelwerte, sodass Doppelbestimmungen ausreichen.

Mittelwert und Standardabweichung wurden nach den üblichen statistischen Methoden berechnet (8, 12).

SAYERS et al. konnten durch Verwendung von Hx-Ratten (2 Tage nach Hypophysektomie) die Empfindlichkeit des Assays steigern (70). Wir übernahmen dieses Verfahren bisher nicht, da es uns zu aufwendig erschien und im mittleren und oberen Messbereich der Eichkurve sogar wesentlich ungenauer ist. Ausserdem ist diese weitere Empfindlichkeitssteigerung keine Lösung für irgendeines der anstehenden Probleme bei der Serumbestimmung (s.Kap.4.1. und 4.2.).

3.3. Vorversuche zur Optimierung der Methode.

3.3.1. Rührgeschwindigkeit bei der Zellpräparation.

Bei der von uns gewählten Umdrehungszahl von 500 U/min. bei der Zellpräparation wird nur ein Teil der Zellen aus den Nebennierestückchen herausgelöst (s.Kap. 3.2.3.). Durch Erhöhung der Rührgeschwindigkeit auf 550 - 650 U/min. sollte eine höhere Ausbeute erzielt werden. Die Zellzahl stieg jedoch nicht an. Im Lichtmikroskop zeigte sich eine starke Zunahme der Zellfragmente; nahezu

alle Zellen waren beschädigt. Auch stieg in diesen Präparationen der Corticosteronbasiswert auf 3-6fach höhere Werte an, während die maximale Corticosteronproduktion etwa gleich hoch blieb, d.h. die Eichkurven verliefen deutlich flacher. Auch war die Streuung der Einzelwerte grösser. Beide Faktoren führten zu einer Minderung der Empfindlichkeit und Genauigkeit der Methode, sodass z.B. statt 1 bis 2,5 pg ACTH nur 10 bis 15 pg von Null zu unterscheiden waren. Eine niedrigere Rührgeschwindigkeit als 500 U/min. liess die Zell-Ausbeute so gering werden, dass die Corticosteronproduktion und damit die Empfindlichkeit der Methode zu stark eingeschränkt wurde.

Unter den von uns gewählten Bedingungen ergab sich bei 30 Versuchen ein Corticosteron-Basiswert (Proben ohne Standard) von $45,5 \pm 11,5$ ng ($\bar{x} \pm s$). Er war vor und nach der Inkubation gleich gross, d.h. ohne ACTH findet während der zweistündigen Inkubation keine messbare Corticosteronproduktion statt bzw. halten sich Corticosteron-Produktion und -Abbau die Waage.

3.3.2. Trypsinpräparate.

Es wurden lyophilisierte Präparate der Fa. Merck, Darmstadt, und der Fa. Worthington Biochem.Corp. in gleichen Gewichtsmengen verwendet. Bei Einsatz des Präparates der Fa. Merck ergab sich ein mindestens 5-fach grösseres Sediment beim Abzentrifugieren der Zellsuspension. Es war von weisslicher Farbe. Im Licht- und Immersionsmikroskop zeigten sich unter sehr vielen Zellfragmenten nur relativ wenig intakte Zellen. Die Zellzahl betrug bei der Aufschwemmung mit 60 ml LBI-Puffer durchschnittlich 85 000/ml ($N = 6$) gegenüber 90 000 - 120 000 beim Trypsin der Fa. Worthington ($N = 8$); der Corticosteron-Basiswert lag dagegen um etwa 50% höher. Die Empfindlichkeit war mit 2,5 - 5 pg schlechter gegenüber 1 - 2,5 pg und der maximale Corticosteronanstieg mit durchschnittlich 1000 ng gegenüber 1500 ng pro Probe niedriger.

Der Zelniederschlag bei Einsatz des Trypsinpräparates der Fa.

Worthington war rötlich-braun und enthielt sehr viel weniger Verunreinigungen. Offensichtlich bedingen Aktivitätsdifferenzen der beiden Trypsin-Präparate (s.Kap. 3.2.1.) die unterschiedliche Wirkung.

Wir verwendeten in den weiteren Untersuchungen ausschliesslich das Präparat der Fa. Worthington.

KITABCHI (33) berichtete von grossen Diskrepanzen zwischen den einzelnen Trypsinpräparationen (Fa.Worthington). Wir fanden zwar einen deutlichen Unterschied zwischen den Präparaten der beiden Firmen, für die verschiedenen Chargen des Präparates einer Firma konnten aber Aktivitätsdifferenzen nicht bewiesen werden, zumal es nicht immer möglich ist, alle anderen Parameter ganz konstant zu halten, was für einen ganz genauen Vergleich notwendig wäre.

3.3.3. Einfluss der Konzentration an Proteasen-Inhibitoren auf die ACTH-Aktivität.

3.3.3.1. Erhöhung der LBI-Konzentration.

In den folgenden Untersuchungen sollte geklärt werden, ob die nach der Vorschrift von SAYERS zunächst übernommene LBI-Konzentration (= 0,1%; s.Kap.3.2.2.) in der Zellsuspension zur Neutralisierung des Trypsins ausreicht, oder ob durch Erhöhung des LBI-Zusatzes eine weitere Steigerung der Empfindlichkeit zu erzielen war. Wir verglichen deshalb gleiche ACTH-Standardproben bei verschiedenen LBI-Konzentrationen (0,1, 0,2, 0,3%), s.Tab.3. Die Ergebnisse resultieren aus mehreren Experimenten, wobei allerdings die jeweils gleiche ACTH-Standardkonzentration mit verschiedenen LBI-Zusätzen immer im selben Versuch angesetzt wurde, um eine echte Vergleichsmöglichkeit zu haben. Im oberen Bereich der Eichkurve führen kleine Verschiebungen, wegen des sigmaförmigen Verlaufs der Dosis-Wirkungsbeziehung ACTH-Cortico-steron, zu grossen Schwankungen der ACTH-Werte. Hier muss deswegen der relative Corticosteronanstieg als zuverlässigere Vergleichsgrösse herangezogen werden.

Tab. 3: Einfluss verschiedener LBI-Konzentrationen (0,1%, 0,2%, 0,3%) auf die Empfindlichkeit des IAC-Assays.

Die mit einer LBI-Konzentration von 0,1% erhaltenen Werte wurden gleich 100% gesetzt und die übrigen Werte entsprechend errechnet. Angegeben sind jeweils $\bar{x} \pm s$. (Versuche mit h- $ACTH_{1-39}$).

ACTH einge- setzt, in pg	LBI-Konz. in %	ACTH gefunden in %		Corticosteron- anstieg in %	N
5	0,2	156 $\pm$	5	170 $\pm$ 5	2
12,5	0,2	130 $\pm$	4	150 $\pm$ 5,2	2
50	0,2	115 $\pm$	3,2	127 $\pm$ 4,5	2
100	0,2	220 $\pm$	15	135 $\pm$ 3	4
1000	0,2	(>100)		135 $\pm$ 0,2	2
10	0,3	125 $\pm$	6	148 $\pm$ 6,5	4
50	0,3	119 $\pm$	6,3	137 $\pm$ 5,1	6
100	0,3	(400 $\pm$ 250)		150 $\pm$ 11	4
500	0,3	(>100)		133 $\pm$ 6	3
1000	0,3	(>100)		135 $\pm$ 7,5	2

In allen Fällen war durch Erhöhung der LBI-Konzentration eine Aktivitätssteigerung zu verzeichnen. Die Aktivitätssteigerung mit 0,3% LBI war allerdings nur unwesentlich grösser als mit 0,2% LBI.

$ACTH_{1-23}$ verhielt sich im Prinzip genauso wie h- $ACTH_{1-39}$. Auch der Nachweis von endogenem ACTH ist durch höheren LBI-Zusatz empfindlicher zu machen. In 2 Seren ergab sich beim Vergleich von 0,1 und 0,15% LBI-Zusatz eine Steigerung der Corticosteron-Produktion auf $110,8 \pm 3,5\%$ (N = 4).

Diese Ergebnisse sind insofern überraschend, da 0,1 mg LBI 3,5 mg Trypsin hemmen (nach Angaben des Herstellers), d.h. der LBI im Überschuss vorhanden sein müsste. Es müssen also zusätzlich zu den von der Zellpräparation stammenden Trypsinresten proteolytische Aktivitäten, z.B. aus den Nebennieren selbst, aus den zugesetzten Seren und möglicherweise vom Albumin der verwendeten Puffer, wirksam sein. Es wäre andererseits aber auch

denkbar, dass bei der Inaktivierung des Trypsins durch den LBI - die nach dem Massenwirkungsgesetz erfolgt (81) - bei 0,1% LBI das Gleichgewicht noch nicht ausreichend zugunsten des Inhibitor-Trypsin-Komplexes verschoben ist. Die dritte Möglichkeit ist, dass der LBI noch eine zusätzliche, bisher unbekannte Wirkung auf die ACTH-Aktivität ausübt. Dafür spricht, dass auch bei sehr hohen ACTH-Konzentrationen (500 und 1000 pg), bei denen eine nennenswerte proteolytische Zerstörung unwahrscheinlich ist, durch LBI-Erhöhung noch ein deutlicher Aktivitätsanstieg zu erzielen ist.

Alle diese Untersuchungen wurden mit LBI der Fa. P-L-Biochemical gemacht. Auch das Präparat der Fa. Worthington Biochem. Corp. erwies sich in einer Konzentration von 0,1% als zu wenig aktiv; durch Erhöhung auf die 2- bzw. 3-fache Menge konnte die ACTH-Aktivität in etwa gleichem Ausmass gesteigert werden wie beim erstgenannten Präparat. FEHM et al. fanden mit 0,1% LBI nach zweistündiger Inkubation von 2 ng ACTH/ml in allerdings 1:10 (!) verdünntem Plasma keine deutliche Abnahme des biologisch aktiven ACTH bzw. des ACTH-Peaks bei radiochromatographischen Untersuchungen; ohne LBI war nach 2 Stunden das meiste ACTH zerstört (15).

3.3.3.2. Trasylo^R-Zusatz zu den ACTH-Lösungen.

Trasylo^R verhindert durch Inaktivierung proteolytischer Enzyme im Plasma die Zerstörung des ACTH (4, 5, 52, 96).

Bei den Untersuchungen, ob dies auch für unsern Assay gilt, überprüften wir zunächst den Trasylo^R-Einfluss bei einer LBI-Konzentration von 0,1% in der Zellsuspension. Bei Zusatz von 5 bis 100 KIE Trasylo^R pro Serumprobe stiegen die gemessenen ACTH-Aktivitäten in Abhängigkeit von der zugefügten Trasylo^R-Menge an (Tab. 4a). Auch bei Zugabe von exogenem ACTH zum Serum (Tab. 4b) und sogar bei ACTH-Standards ohne Serumzusatz (Tab. 4c und 4d) war dieses Phänomen zu beobachten. Dabei ergab sich zwischen dem ACTH₁₋₂₃, h-ACTH₁₋₃₉ und Schweine-ACTH₁₋₃₉ kein prinzipieller Unterschied. Der Einfluss des Trasylo^R ist bei

Tab. 4: Einfluss von Trasylol^R auf Standards, endogenes und exogenes ACTH im Serum bei 0,1% LBI. Alle Messwerte wurden jeweils an der Eichkurve mit 0,1% LBI und ohne Trasylol^R abgelesen. Die ohne Trasylol^R-Zusatz erhaltenen Werte wurden gleich 100% gesetzt und die übrigen Werte entsprechend in % errechnet.

a) Endogenes ACTH im Serum. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte von 2 Bestimmungen.

Serum	Vol.einge- setzt	ACTH gefunden ohne Trasylol ^R	Trasylol ^R - Zusatz	ACTH gefunden mit Trasylol ^R	
	in µl	in pg	KIE	in pg	in %
L	10	46,5	5	50,3	108
L	10	46,5	20	54,3	117
L	10	46,5	50	59,0	126
L	10	34	100	35,5	105
L	10	35	50	40,0	114
L	10	35	100	55,0	158
E	50	43,7	100	55,0	126
E	10	6,9	100	7,8	112
B	100	52,0	80	58,0	112

b) Wiederfindung von 100 pg Schweine-ACTH in 90 µl Normal-Serum. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte von 2 Bestimmungen.

Serum	ACTH gefunden ohne Trasylol ^R	Trasylol ^R - Zusatz	ACTH gefunden mit Trasylol ^R	ACTH- Anstieg
	in pg	KIE	in pg	in %
S	30,0	50	58	193
M	53,2	20	67	122
M	53,2	50	74	139
M	53,2	100	76	143

c) h-ACTH₁₋₃₉-Standard

ACTH einge- setzt	Trasylol ^R - Zusatz	ACTH gefunden	N
in pg	KIE	in %, $\bar{x} \pm s$	
1	100	200 $\pm$ 21	2
2,5	100	144 $\pm$ 12	3
5	100	126 $\pm$ 12	6
10	50	109 $\pm$ 1	2
10	100	123 $\pm$ 15	5
50	50	124 $\pm$ 6	2
50	100	125 $\pm$ 15	8
100	100	100 $\pm$ 19	6
500	50	98 $\pm$ 11	2
500	100	80 $\pm$ 20	3
1000	100	66 $\pm$ 27	5

d) ACTH₁₋₂₃-Standard

5	100	148 $\pm$ 25	3
50	100	136	1
100	100	80	1
1000	100	64 $\pm$ 22	4

Standards und Serumproben etwa gleich gross (Tab.4), sodass die jeweils an der richtigen Eichkurve (mit entsprechendem Trasylol^R-Zusatz) abgelesenen Serum-ACTH-Werte gleich bleiben. Dasselbe gilt im Prinzip auch für eine LBI-Erhöhung (siehe 3.3.3.1.).

Auffallend ist, dass der Einfluss des Trasylol^R bei kleinen ACTH-Mengen besonders gross ist; der Assay wird also empfindlicher. Dagegen flachen die Eichkurven mit Trasylol^R-Zusatz im oberen Messbereich schneller ab. Eine Erklärung hierfür fanden wir nicht. Bei einer Erhöhung der Trasylol^R-Menge auf 200 KIE pro Probe flacht die Eichkurve schon bei 50 pg ACTH ab.

In weiteren Versuchen sollte geklärt werden, ob auch bei höheren LBI-Konzentrationen ein Trasylol^R-Einfluss zu erkennen ist. Wie die Tab. 5 zeigt, konnte bei 0,2% LBI noch eine deutliche Aktivitätssteigerung erzielt werden, nicht dagegen bei 0,3% LBI;

Tab. 5: Einfluss von 100 KIE Trasylol^R auf Standardproben mit einer LBI-Konzentration von 0,2 bzw. 0,3%. Die mit 0,2 bzw. 0,3% LBI erhaltenen Werte wurden gleich 100% gesetzt und die Werte mit Trasylol^R-Zusatz entsprechend in % errechnet. Angegeben sind jeweils $x \pm s$.

a) ACTH₁₋₂₃-Standard mit 0,2% LBI.

ACTH eingesetzt in pg	ACTH gefunden mit Trasylol ^R , in %	N
1	190 $\pm$ 30	3
5	141 $\pm$ 8	2
8	123 $\pm$ 4	3
12,5	127 $\pm$ 6	4
50	136 $\pm$ 7	2
1000	75 $\pm$ 11	2

b) h-ACTH₁₋₃₉-Standard in 0,3% LBI.

11	111 $\pm$ 5	2
16,2	107 $\pm$ 5	2
85	106 $\pm$ 8	2
100	115 $\pm$ 20	3

hier lag die Steigerung z.T. innerhalb der Schwankungsbreite der Einzelwerte.

Eine optimale Kombination von Trasylol^R-Zusatz und LBI-Erhöhung ergab sich also bei 0,2% LBI + 100 KIE Trasylol^R.

Von Versuch zu Versuch war der Trasylol^R-Einfluss unterschiedlich stark, weshalb die Standardabweichungen in Tab. 4 und 5 z.T. recht gross sind. Der Grund hierfür ist uns ebenfalls unbekannt. Die Hemmung zusätzlicher Proteasen wäre - wie schon beim LBI-Einfluss diskutiert - auch für die Trasylol^R-Wirkung die wahrscheinlichste Erklärung. Es fällt aber auf, dass bei 0,2% LBI zwar durch 100 KIE Trasylol^R noch eine deutliche Aktivitätssteigerung zu erzielen ist, nicht aber durch eine Erhöhung der LBI-Konzentration von 0,2% auf 0,3% ohne Trasylol^R-Zusatz.

Dieser Befund spricht dafür, dass eine gewisse Sättigung durch den LBI eingetreten ist und dass Trasylol^R und LBI nicht ausschliesslich dieselbe Wirkung haben.

Auf Grund dieser Ergebnisse setzen wir ab jetzt jeder Probe 0,2% LBI + 100 KIE Trasylol^R zu; dabei erhalten wir einen sehr empfindlichen Messbereich zwischen 1 und 100 pg ACTH pro Probe.

Um eine Zerstörung des endogenen ACTH auch vor der Inkubation zu verhindern, empfiehlt es sich, bereits bei der Blutabnahme Trasylol^R zuzufügen. Wir setzen 400 KIE pro ml Blut zu (siehe 2.1.2.).

3.3.4. 2-Mercaptoäthanol als Störfaktor.

Das im RIA zum Schutz des ACTH vor Zerstörung (z.B. Oxydation des Methionin-Restes in Position 4) und Adsorption häufig verwendete 2-Mercaptoäthanol (14, 45, 88, 96, 99) bewirkte in Konzentrationen von 0,2% eine etwas erhöhte ACTH-Aktivität bei Standardproben bis einschliesslich 50 pg ($112 \pm 12\%$, $N = 8$), bei ≥ 100 pg stets eine erniedrigte. Bei Konzentrationen $\geq 0,5\%$ war in allen Fällen eine Hemmung der Corticosteronsynthese zu verzeichnen. Die Ursache hierfür dürfte eine direkte Schädigung der Zellen sein. 0,02% Mercaptoäthanol zeigten keinen Einfluss auf den Assay. Diese Versuche wurden unter den üblichen Versuchsbedingungen durchgeführt (s. Kap. 3.2.).

Bei 2 Seren mit 58 bzw. 2 pg ACTH pro 100 μ l konnten durch Zusatz von 0,2% Mercaptoäthanol keine höheren Werte erzielt werden.

Da das Mercaptoäthanol in diesem Assay keine eindeutige Schutzfunktion für das ACTH zeigte, insbesondere Serumwerte unbeeinflusst blieben, verwendeten wir - gerade auch wegen der fraglichen Zellschädigung - in den weiteren Versuchen diese Substanz nicht mehr.

3.3.5. Untersuchungen mit verschiedenen Inkubationszeiten.

3.3.5.1. Eichkurven mit h-ACTH₁₋₃₉ bei verschiedenen Inkubationszeiten.

Abb. 4 zeigt Eichkurven mit h-ACTH₁₋₃₉ bei verschiedenen Inkubationszeiten. Bei allen eingesetzten ACTH-Konzentrationen stieg die produzierte Corticosteronmenge mit zunehmender Inkubationszeit an, d.h. der Assay wurde empfindlicher. Es ist anzunehmen, dass die Corticosteron-Produktion noch über die 3-Stunden-Grenze hinaus weiter anhält. Wir entschieden uns in den weiteren Versuchen für eine Inkubationszeit von 2 Stunden, weil hierbei eine ausreichende Empfindlichkeit erzielt wird und längere Inkubationszeiten keinen bedeutenden Vorteil mehr bieten.

Zeichnet man den Corticosteronanstieg in Abhängigkeit von der Inkubationszeit auf (Abb.5), so erhält man bei ACTH-Konzentrationen bis zu 100 pg eine lineare Beziehung zwischen diesen beiden Größen, mit Ausnahme der ersten 30 min.; hier weisen die Kurven einen Knick auf. Folgt man in Richtung Inkubationsbeginn weiterhin dem geraden Verlauf statt dem Knick (gestrichelte Linien in Abb. 5), so trifft man auf die Zeitskala zwischen der 5 min.- und der 20 min.-Marke. Der Schnittpunkt auf der Zeitskala, an dem offensichtlich erst die Corticosteronproduktion beginnt, ist umso weiter vom Nullpunkt entfernt, je niedriger die ACTH-Konzentration ist. Dies trägt sicher mit

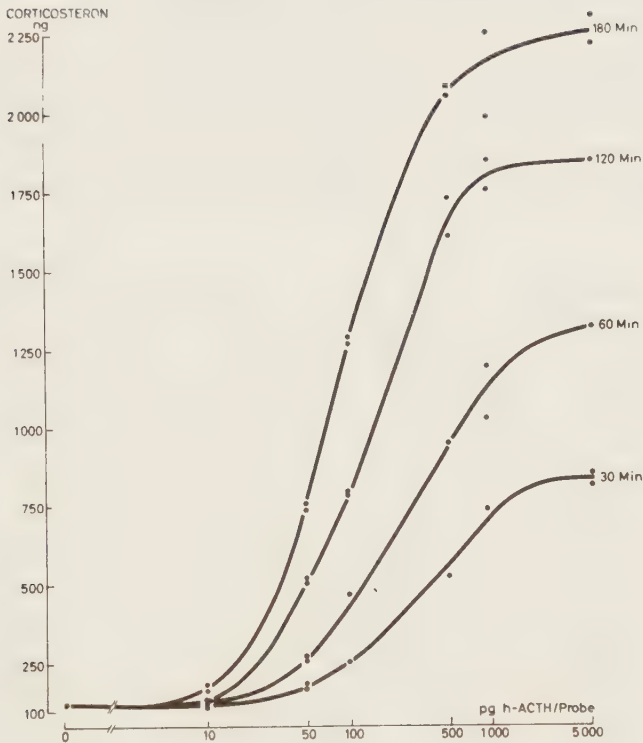


Abb.4: h- ACTH_{1-39} -Eichkurven bei verschiedenen Inkubationszeiten.
Die produzierte Corticosteron-Menge steigt mit zunehmender Inkubationszeit an.

dazu bei, dass die Empfindlichkeit des Assays im unteren Messbereich bei kurzen Inkubationszeiten abnimmt (s.o.). KITABCHI (33) spricht von einer Verzögerungsperiode am Inkubationsbeginn, bei ihm ca. 6 min. sowohl bei 50 pg als auch bei 500 pg.

Wir fanden dagegen, dass ab 500 pg der Corticosteronanstieg nicht mehr linear zur Inkubationsdauer verläuft, sondern in den ersten 30 min. am steilsten ist (also keine Verzögerungs-

periode); danach flacht er mit zunehmender Inkubationszeit ab. SAYERS et al. (68) fanden mit Schweine- ACTH_{1-39} eine gleichbleibende Corticosteronsynthese bis zur 90. Minute, allerdings ohne Angabe der eingesetzten ACTH-Menge und der im einzelnen untersuchten Zeit. Nach der 90. Minute wurde der Corticosteronanstieg geringer. Dagegen berichten KITABCHI et al. (33) von einer linearen Beziehung zwischen der 6. und der 180. Minute bei Versuchen mit 500 pg ACTH (USP-Corticotropin-Standard).

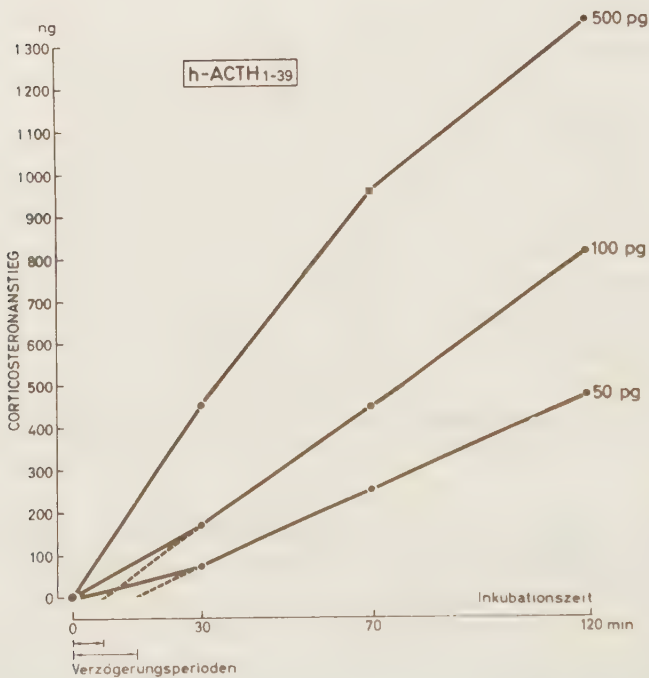


Abb. 5: Abhängigkeit des Corticosteronanstiegs von der Inkubationszeit und der eingesetzten ACTH-Menge. Einzelheiten im Text. Für 10 pg wurde eine Verzögerungsperiode von 20 min. ermittelt; graphisch liess sich dies wegen des relativ flachen Kurvenverlaufs nicht darstellen.

3.3.5.2. Vergleich von ACTH₁₋₂₃, h-ACTH₁₋₃₉ und Schweine-ACTH₁₋₃₉ bei verschiedenen Inkubationszeiten.

Die Abb. 6 zeigt den Vergleich verschiedener ACTH-Standardpräparationen bei einer Inkubationszeit von 2 Stunden.

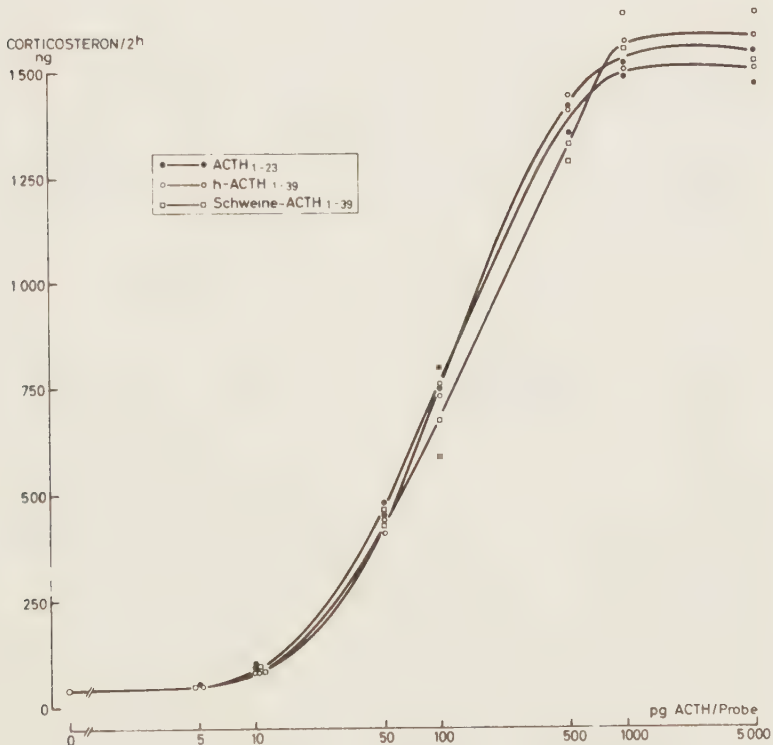


Abb. 6: Vergleich der Eichkurven von ACTH₁₋₂₃, h-ACTH₁₋₃₉ und Schweine-ACTH₁₋₃₉ bei einer Inkubationszeit von zwei Stunden. Es ergaben sich weitgehend identische Dosis-Wirkungs-Beziehungen.

ACTH₁₋₂₃ und h-ACTH₁₋₃₉ ergaben eine fast identische Dosis-Wirkungs-Beziehung, d.h. die Corticosteron-Produktion - bezogen auf gleiche Gewichtsmengen ACTH - war etwa gleich gross.

Die Eichkurve des Schweine ACTH₁₋₃₉ war zwischen 50 und 1000 pg etwas nach rechts verschoben, d.h. geringfügig unempfindlicher. Es lässt sich daraus allerdings kein sicherer Wirkungsunterschied ableiten, da beim Abwiegen dieser Substanz (im 100 µg Bereich) mit einem Wiegefehler bis zu 15% gerechnet werden musste. Als nächstes verglichen wir ACTH₁₋₂₃ und h-ACTH₁₋₃₉ bei einer Inkubationszeit von 30 min. In dieser kürzeren Inkubationszeit bewirkte das 1-23er Peptid eine deutlich stärkere Corticosteronproduktion als das h-ACTH₁₋₃₉; es entsprach zu diesem Zeitpunkt etwa der doppelten Menge h-ACTH₁₋₃₉. In Abb. 7 ist diese zeitliche Abhängigkeit der



Abb.7: Vergleich von ACTH₁₋₂₃- und h-ACTH₁₋₃₉-Standards (50 und 100 pg) zu verschiedenen Inkubationszeiten. Schnellerer Wirkungseintritt bzw. schnellerer Wirkungsverlust des ACTH₁₋₂₃. Der Corticosteronanstieg von 50 pg ACTH₁₋₂₃ entsprach nach 30 min. Inkubation 110 pg h-ACTH₁₋₃₉, nach 120 min. Inkubation 57 pg h-ACTH₁₋₃₉. 100 pg ACTH₁₋₂₃ entsprachen nach 30 min. 191 pg h-ACTH₁₋₃₉, nach 120 min. 98 pg.

Corticosteron-Produktion jeweils für 50 bzw. 100 pg ACTH₁₋₂₃ und h-ACTH₁₋₃₉ dargestellt. Diese Beziehung ergab sich auch für 25 pg und 150 pg ACTH₁₋₂₃ (nach 30 min. Inkubation entsprach die produzierte Corticosteronmenge 36,5 bzw. 250 pg h-ACTH₁₋₃₉, nach 120 min. 15,7 bzw. 133 pg). Diese Versuche wurden mit 0,1% LBI durchgeführt; Vergleichsuntersuchungen mit 0,2% LBI brachten dasselbe Ergebnis. Die für h-ACTH₁₋₃₉ beschriebene Verzögerungsperiode (siehe Abb.5) ist beim ACTH₁₋₂₃ also nicht festzustellen (siehe Abb.7).

Eine plausible Erklärung für diese unterschiedlichen Kinetiken wäre, dass bei Einsatz gleicher Gewichtsmengen ACTH₁₋₂₃ zwar zunächst (bei 30 min. Inkubationsdauer) eine höhere biologische Aktivität aufweist - was auf Grund des niedrigeren Molekulargewichtes auch zu erwarten ist - dann aber schneller inaktiviert bzw. abgebaut wird, sodass mit zunehmender Inkubationszeit die Corticosteronmenge relativ weniger ansteigt und dadurch die Angleichung an die Corticosteronproduktion des h-ACTH₁₋₃₉ zustande kommt. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass diese unterschiedlichen Kinetiken durch die anderen biochemischen und physikalischen Eigenschaften des ACTH₁₋₂₃ (Fehlen der terminalen Aminosäurenkette) bedingt sind.

Von dieser stärkeren initialen Wirkung des ACTH₁₋₂₃ an isolierten Nebennierenzellen ist nach unserer Kenntnis bisher nicht berichtet worden. Möglicherweise ist die von GEWIRTZ et al. (23) und SEELIG et al. (77) beobachtete ca. 1,4-fach höhere Aktivität des ACTH₁₋₂₄ (Synacten^R) gegenüber dem h-ACTH₁₋₃₉ bzw. Schweine-ACTH₁₋₃₉ (bezogen auf die molare Konzentration) durch diesen Wirkungsunterschied bedingt, da diese Autoren nur eine Inkubationszeit von 1 Stunde gewählt hatten.

Bei Untersuchungen am Menschen haben verschiedene Autoren eine zeitlich kürzere steroidogene Aktivität von synthetischen ACTH₁₋₂₄ bzw. ACTH₁₋₁₉ im Vergleich zu den physiologischen 39er Peptiden festgestellt (17, 35).

In entsprechenden Versuchen mit h-ACTH₁₋₃₉ und Schweine-ACTH₁₋₃₉, die in äquimolaren Mengen menschlichen Versuchspersonen i.v. verabreicht wurden, fanden UPTON et al. bei beiden Präparaten

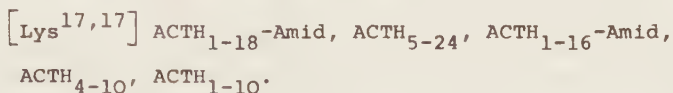
einen gleich hohen Cortisolanstieg (86). Beim Schweine- ACTH_{1-39} trat jedoch der Cortisolanstieg schneller ein, während die Wirkung des h- ACTH_{1-39} länger anhielt. Bei chromatographischen Untersuchungen mit dem aus den Plasmen der Versuchspersonen extrahierten exogenen h- ACTH_{1-39} bzw. Schweine- ACTH_{1-39} konnten sie eine wesentlich grössere "binding affinity" des h- ACTH_{1-39} gegenüber Plasmaproteinen wahrscheinlich machen. UPTON et al. erwogen die Möglichkeit, dass die Proteinbindung das ACTH vor Zerstörung schützt und sich somit die längere biologische Aktivität des h- ACTH_{1-39} erklären lässt.

Bei der von uns gewählten Inkubationszeit von 2 Stunden (siehe Kap. 3.3.5.1.) verhalten sich also - bezogen auf Gewichtsangaben - das ACTH_{1-23} und h- ACTH_{1-39} identisch, so dass pg-Angaben für Proben unbekannter Konzentration in gleicher Weise auf beide Standards zu beziehen sind. Das gilt aber nicht für die Angaben von Internationalen Einheiten. Diese Angaben sind stets relativ, abhängig von der Standardpräparation, mit der verglichen wird und von dem Bioassay, der zu diesem Vergleich herangezogen wird. Diese nur relative "Richtigkeit" von Angaben der ACTH-Aktivität in I.E. gilt natürlich auch für Serummesswerte. Es müssen stets der Standard, auf den bezogen wird, und die Methode, mit der dieser Standard bezüglich seiner biologischen Aktivität gemessen wurde, angegeben werden. In dieser Arbeit werden deshalb grundsätzlich nur ACTH-Gewichtsmengen und der eingesetzte Standard angegeben.

3.3.6. Spezifität des IAC-Assays.

Zur Spezifität des IAC-Assays sei vor allem auf die Arbeiten von SEELIG und SAYERS (68, 77, 78, 79) sowie KITABCHI (33) verwiesen. Neben den physiologischen ACTH-Molekülen verschiedener Spezies (Mensch, Schwein, Ratte) und den synthetischen ACTH_{1-23} bzw. ACTH_{1-24} wurden zahlreiche andere Substanzen auf ihre stimulierende Wirkung auf die Corticosteronproduktion der Nebennierenzellen im IAC-Assay untersucht.

Dabei fanden SEELIG und SAYERS bei ihren Untersuchungen mit ACTH-Fragmenten eine steile Abnahme der molaren ACTH-Aktivität in der folgenden Reihenfolge:



Jedoch konnten sie mit entsprechend höheren Konzentrationen jeweils die mit dem Standard maximal mögliche Corticosteronproduktion erreichen. Die Dosis-Wirkungskurven der oben aufgeführten ACTH-Fragmente verliefen - bei logarithmischer Aufzeichnung der ACTH-Konzentration - alle parallel zur Eichkurve mit ACTH_{1-24} bzw. Schweine- ACTH_{1-39} . Mit ACTH_{11-24} fanden sie keine Corticosteronproduktion; es zeigten sich dagegen antagonistische Eigenschaften, d.h. die Wirkung von aktiven ACTH-Molekülen wurde gehemmt. SEELIG und SAYERS schlossen daraus, dass die Aminosäuren 5-10 bzw. 4-10 das aktive Zentrum bilden und die Sequenz 11-24 die Affinität zum Rezeptor erhöht.

Darüber hinaus fand sich eine ausgezeichnete Korrelation zwischen Corticosteronsynthese und cyclo-AMP-Produktion. Dieser Befund ist sehr gut vereinbar mit der für das c-AMP angenommenen und durch viele Befunde belegten "second messenger"-Rolle bei der Stimulation der Corticosteronproduktion durch ACTH (7, 26, 43, 57, 85). Ein weiterer Beweis hierfür ist die Tatsache, dass mit c-AMP selbst, aber auch mit Dibutyryl-c-AMP, c-GMP und c-IMP eine deutliche Stimulation der Corticosteronproduktion möglich war.

"Big ACTH", das wahrscheinlich eine Vorstufe des physiologisch wirksamen Hormons darstellt, zeigt erst nach Behandlung mit Trypsin biologische Aktivität (Versuche von GEWIRTZ et al., (23), siehe Kap. 4.3.1.4.).

KITABCHI und SAYERS konnten eine hohe Spezifität des IAC-Assays gegenüber anderen Hormonen nachweisen. Selbst in sehr hohen Dosen bewirkten Pro-Insulin, Insulin, Oxytocin, Vasopressin,

Angiotensin II, Glucagon, hGH und Epinephrin keine Stimulation der Corticosteron-Produktion. Dagegen war mit 10^7 pg α -MSH eine geringe Corticosteron-Produktion zu erzielen, nämlich entsprechend ca. 10 pg ACTH. Die 13 Aminosäuren des α -MSH sind identisch mit den Aminosäuren 1-13 des ACTH; allerdings besitzt das N-terminale Serin eine N-Acetylgruppe und das C-terminale Valin liegt als Amid vor.

3.3.7. Volumen der zugesetzten ACTH-Lösung.

In den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, ob die Corticosteron-Produktion bei einer bestimmten ACTH-Menge unabhängig ist vom zugefügten Volumen, in der sich die ACTH-Menge befindet. Wenn dem so wäre, so könnte - z.B. bei relativ niedrigen Konzentrationen - durch eine Volumenerhöhung die untere Messgrenze des Assays, bezogen auf die ACTH-Konzentration im zugefügten Medium, gesteigert werden.

Die Tab. 6 zeigt die Ergebnisse für h-ACTH₁₋₃₉ in zugesetzten Volumina von 200 bzw. 300 μ l im Vergleich zu dem sonst üblichen zugesetzten Volumen von 100 μ l (LBI-Konzentration der Zellsuspension = 0,1%; 100 KIE Trasylol/100 μ l ACTH-Standard). Die Werte für 100 μ l wurden gleich 100% gesetzt. In allen Fällen wurde zumindest der erwartete Wert (= 100%) gefunden, z.T. ergaben sich höhere Werte. Letzteres könnte evtl. durch die zwei- bzw. dreifach höhere Trasylolmenge bedingt sein, zumal in Standards ohne Trasylolzusatz erhöhte Standard-Volumina zu geringeren als den erwarteten ACTH-Ausbeuten, nämlich nur zwischen 67 und 91% führten. Ähnlich wie in Kap. 3.3.3.2. war allerdings auch hier der Trasyloleinfluss von Versuch zu Versuch unterschiedlich gross.

Zum Verhalten des endogenen ACTH bei verschiedenen Serumvolumina siehe Kap. 4.1.2. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass von einem Einsatz unterschiedlicher Volumina, in denen ACTH bestimmt werden soll, abgeraten werden muss, da durch die unterschiedlichen Versuchsbedingungen nicht vorhersehbare und

damit nicht erfassbare Abweichungen von der Normaleichkurve auftreten können.

Tab. 6: Einfluss erhöhter Standard-Volumina im IAC-Assay.

Die ACTH-Werte der Standards mit 100 µl wurden gleich 100% gesetzt und die ACTH-Werte der Standards mit höherem Volumen, aber jeweils gleicher ACTH-Menge, entsprechend in % errechnet. Versuche mit 0,1% LBI in der Zellsuspension und 100 KIE Trasylol pro 100 µl ACTH-Standard. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte aus 2 Bestimmungen.

Standard- volumen µl	ACTH eingesetzt (= erwartet) in pg	ACTH gefunden	
		in pg	in %
100	5-1000		100
200	5	5,4	108
200	12,5	15,8	126
200	12,5	20,0	160
200	25	27,7	110
200	25	30,9	124
200	200	258	129
200	200	202	101
200	1000	1000	100
200	1000	>1000	>100
300	12,5	17,8	142
300	12,5	13,4	106

3.3.8. Schlussfolgerung aus den Vorversuchen.

Auf Grund der in Kap. 3.3.1. bis 3.3.7. erzielten Ergebnisse wird der IAC-Assay unter folgenden Standardbedingungen bei uns durchgeführt:

1. Rührgeschwindigkeit bei der Zellpräparation: 500 U/min.
2. Verwendung des hochaktiven Trypsin-Präparates der Fa. Worthington Biochem.
3. Proteaseninhibitor-Konzentration: 0,2% LBI (Zellsuspension) + 100 KIE Trasylol^R pro Probe.
4. Inkubationszeit der Proben: 2 Stunden.
5. Volumen der zu messenden Probe (Standard, Serum o.ä.) : 100 µl.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1. Zur Richtigkeit der mit dem IAC-Assay gemessenen ACTH-Spiegel im Serum bzw. Plasma.

4.1.1. Messung der endogenen ACTH-Aktivität in Seren von Normalpersonen.

Wir untersuchten wiederholt Seren von Normal-Personen auf ihre endogene ACTH-Aktivität im IAC-Assay. Obwohl unser Assay zur Messung im Bereich physiologischer Konzentrationen (10-50 pg/ml) genügend empfindlich war, konnten wir in keinem der Seren (N = 15) ACTH nachweisen (Versuche bei einer Aufbewahrungstemperatur des Versuchsansatzes bei -80°C , 0,1 und 0,2% LBI sowie mit und ohne Trasylol^R-Zusatz). Teilweise lagen die Corticosteronwerte der Serumproben sogar unter dem Corticosteronbasiswert (= Proben ohne ACTH-Standard). Dies erscheint unverständlich, da ja die Corticosteronbasismenge schon vor Versuchsbeginn in allen Proben enthalten ist und das Corticosteron ein relativ stabiles Molekül darstellt.

Unsere weiteren Untersuchungen galten deshalb diesem "Fehler" bei der direkten ACTH-Bestimmung im Serum mit dem IAC-Assay, sowie der genaueren Charakterisierung der vorliegenden Störsubstanzen.

4.1.2. Parallelität zwischen Standard-Eichkurve und Serum-ACTH in verschiedenen Verdünnungen.

Voraussetzung zur Bestimmung von ACTH-Spiegeln im Serum ist ein gleiches Verhalten von ACTH-Standard und endogenem ACTH im Assay, d.h. dass bei Einsatz verschiedener Serumvolumina die jeweils an der Standard-Eichkurve abgelesenen ACTH-Werte sich um denselben Faktor ändern, wie das eingesetzte Volumen.

Eine solche Beziehung ist im Lipscomb-Nelson-Assay in zahlreichen Bestimmungen festgestellt worden (60 und eigene Untersuchungen, siehe Tab. 12, 18).



Abb.8: Parallelität von Standard-Eichkurve und endogenem ACTH im Serum bzw. Plasma. Bei den Serum-(Plasma-)Bestimmungen wurde jeweils der bei der grössten eingesetzten Volumensmenge (meist 100 μ l) erzielte Corticosteronwert direkt auf der Eichkurve eingetragen, die Corticosteronwerte der kleineren Volumina dann in Höhe der aus den Ergebnissen der grössten Volumina errechneten ACTH-Menge. Die Abweichungen vom Eichkurvenverlauf sind minimal. Alle Seren wurden mit physiologischem pH eingesetzt, die Standards mit 0,5% BSA - pH 3,5. Versuche bei 0,1% LBI.

- h-ACTH₁₋₃₉-Standard Eichkurve
- und ▲ Plasmen von gestressten Ratten
- ▲ Serum eines Patienten mit M.Addison.

Alle anderen Symbole stellen verschiedene Seren von Patienten mit Nelson-Syndrom dar.

Durch die folgenden Versuche sollte geklärt werden, ob auch für den IAC-Assay diese Voraussetzung gegeben ist.

Wie Abb. 8 zeigt, bestätigte sich dies für alle diesbezüglich untersuchten Serum- (bzw. Plasma-) Volumina. Es wurden jeweils verschiedene Volumina zwischen 5 und 100 µl eingesetzt.

Offenbar besteht diese Parallelität zwischen Standard-Eichkurve und endogenem ACTH auch bis zu 200 µl Serumzusatz, denn wie diesbezügliche Untersuchungen mit Serum z. ergaben, war bei Einsatz von 200 µl der erhaltene ACTH-Wert etwa doppelt so hoch wie bei 100 µl (145 pg gegenüber 78,5 pg). Bei 300 µl Serum galt diese Beziehung dagegen überhaupt nicht mehr (112 pg). Diese Versuche wurden bei 0,2% LBI durchgeführt.

Zur Bestätigung der Parallelität bis zu 200 µl Serum sind allerdings weitere Vorversuche erforderlich, zumal auch bei 200 µl Standardproben vereinzelt Abweichungen von der 100 µl Eichkurve auftraten (siehe Kap. 3.3.7.).

4.1.3. Wiederfinderaten von exogenem ACTH im Serum bzw. Plasma.

4.1.3.1. Standard-Eichkurven im Normalplasma.

Als diese Untersuchungen durchgeführt wurden, war der Einfluss von Trasylol^R und erhöhten LBI-Konzentrationen im IAC-Assay noch nicht bekannt. Wir verwendeten deshalb nur 0,1% LBI und kein Trasylol^R. 10 µl Standard und 90 µl Plasma von Normalpersonen wurden am Tag vor dem Versuch zusammen in die Inkubationsgefäße pipettiert, durch leichtes Schütteln gemischt und wie die Standards in den ersten Versuchen bei -15° C eingefroren. Bei dieser Temperatur dauerte es 1 - 2 Stunden, bis die Proben vollständig gefroren waren.

Alle Wiederfinderkurven verliefen zwar parallel zur Eichkurve, doch waren sie weit nach rechts verschoben, sodass nur zwischen 20 und 50% der eingesetzten ACTH-Mengen wiedergefunden wurden. Der Rest musste durch das Plasma inaktiviert worden sein. Auf-

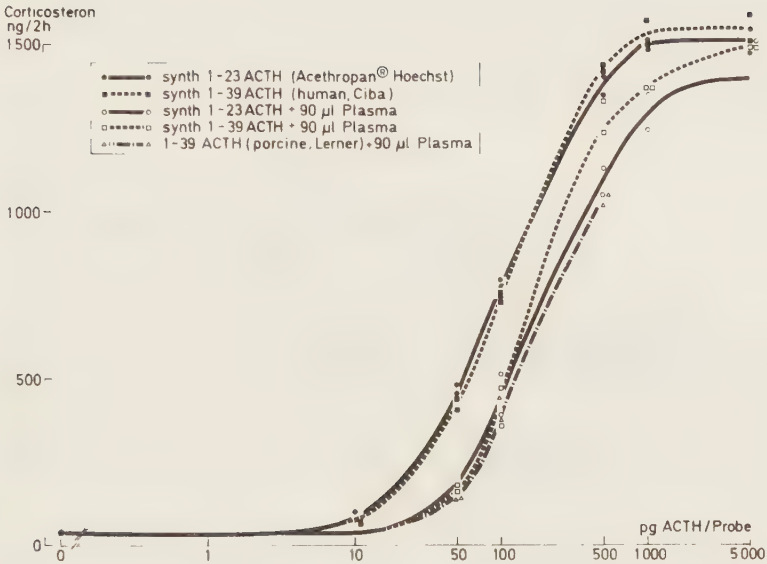


Abb. 9: ACTH-Standard Eichkurven und Wiederfindenkurven im Plasma.

Die Wiederfinderate im Plasma lag bei allen drei ACTH-Präparaten zwischen 20 und 50%.

Die Eichkurve des Schweine-ACTH₁₋₃₉ ist - wegen der besseren Übersicht - nicht eingezeichnet, siehe Abb. 6.

fallend war dabei, dass bei den verschiedenen zugesetzten ACTH-Mengen die Inaktivierung in ein und demselben Plasma einen relativ konstanten Anteil (in %) betrug - d.h. auch niedrige ACTH-Konzentrationen wurden nur z.T. inaktiviert -, während sich von Plasma zu Plasma grössere Schwankungen ergaben.

Erst mit 3000 bzw. 5000 pg konnte in 2 Fällen die maximale Corticosteronproduktion der Standard-Eichkurve erreicht werden, in zwei Versuchen wurde sie nicht ganz erreicht. Die Inaktivierungsaktivität besitzt also beachtliche Ausmasse, ohne dass niedrige ACTH-Konzentrationen vollständig inaktiviert werden.

4.1.3.2. Einfluss von Serumvolumen, Höhe des endogenen ACTH-Spiegels und Aufbewahrungs- bzw. Inkubationszeit.

In weiteren Versuchen sollte die Wiederfindequote in Abhängigkeit vom Serumvolumen und vom endogenen ACTH-Spiegel der Seren untersucht werden. Wir verwendeten jeweils 50 pg ACTH, das wir zu Serumvolumina zwischen 10 und 100 μ l gaben. Die Proben wurden bei -15° C aufbewahrt; die Versuche wurden mit 0,1% LBI (Fa.Biochemical) durchgeführt.

Bei allen Rattenserum und Seren von Normalpersonen bzw. Hx-Patienten ergab sich eine deutliche Abnahme der Wiederfindung mit zunehmendem Volumen, besonders stark ausgeprägt beim Hx-Patienten und bei den Hx-Ratten.

Bei Patienten mit Nelson-Syndrom, die extrem hohe endogene ACTH-Spiegel aufwiesen, wurde nahezu das gesamte zugesetzte ACTH wiedergefunden. Folgende zusätzliche Bestimmungen in einem Patientenserum (956 pg ACTH/100 μ l; Patient mit Nelson-Syndrom) sind nicht in der Abb. enthalten: Wiederfindung von 108% in 100 μ l Serum (bei 100 pg ACTH-Zusatz), von 106 und 101% in 50 μ l Serum (bei 250 bzw. 500 pg ACTH-Zusatz). Auffallend war, dass das Serum eines Patienten mit Nelson-Syndrom, bei dem die Wiederfinderate bei 50 μ l ca. 80% betrug, nach 3-tägiger Aufbewahrung bei $+4^{\circ}$ C nur noch Wiederfinderraten ergab, die denen der Normalseren entsprachen (siehe Abb.10). Die im IAC-Assay gemessene endogene ACTH-Konzentration war inzwischen von 91,5 pg/100 μ l auf nicht mehr messbare Werte abgesunken.

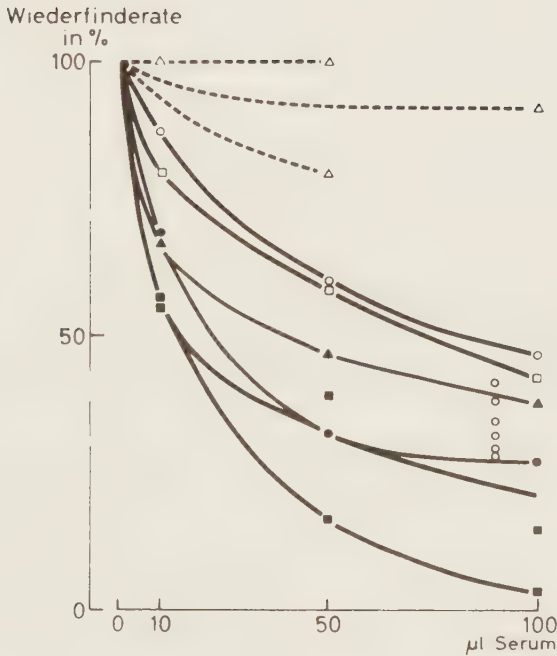


Abb.10: Wiederfindung von 50 pg ACTH₁₋₂₃ im Serum in Abhängigkeit vom endogenen ACTH-Spiegel und zugefügten Serumvolumen.

- △ = Patienten mit Nelson-Syndrom (im IAC-Assay gemessene ACTH-Werte - von oben nach unten - pro 100 µl: 954 pg, 70 pg und 91,5 pg).
- = Normalpersonen
- ▲ = Patient mit Nelson-Syndrom, nach 3-tägiger Aufbewahrung des Serums bei +4°C (0 pg ACTH/100 µl).
- = Hypophysektomierter (Hx) Patient
- = Gestresste Ratte (35 pg ACTH/100 µl)
- = Zwei hypophysektomierte (Hx) Ratten

In späteren Untersuchungen froren wir die Proben sofort nach dem Pipettieren bei -80°C ein bzw. fügten die Seren erst unmittelbar bei Inkubationsbeginn den Standards zu (Versuche mit 0,1% LBI der Fa. Worthington). Hierbei ergab sich folgendes Ergebnis:

Sowohl im Hx-Serum M, als auch bei den Normalseren war die Wiederfindequote mit ca. 80% etwa doppelt so gross wie bei den Versuchen mit -15°C (siehe Abb. 10).

Tab.7: Wiederfindung von 50 pg h-ACTH₁₋₃₉ in verschiedenen Seren bei sofortigem Einfrieren der Proben (-80°C) oder Inkubationsbeginn.

Angegeben sind jeweils die Mittelwerte von 2 Bestimmungen. Serum M = Hx-Serum, alle anderen Seren stammen von Normalpersonen.

Exp.	Proteasen-Inhibitoren		Serum	Vol.einge- setzt in μl	Wiederfindung von 50 pg	
	% LBI	KIE Trasylol ^R			in pg	in %
25.3.	0,2		F.	90	40,5	81
3.4.	0,2	80	X.	90	39	78
27.3.	0,2		X.	100	36,8	73,6
16.4.	0,2		X.	100	42	84
16.4.	0,2		M.	90	40,5	81
16.4.	0,2		O.	90	43,2	86,4
22.5.	0,1		F.	90	36,7	73,4
22.5.	0,1		M.	100	38,3	76,6
22.5.	0,1		M.	200	23,4	46,8
22.5.	0,1		M.	300	14,5	29

Damit waren jetzt auch die Wiederfindequoten in den Seren mit sehr unterschiedlichen endogenen ACTH-Spiegeln fast identisch. Eine Erhöhung der Serummenge auf 200 bzw. 300 μl führte allerdings auch unter diesen Bedingungen zu einem steilen Abfall der Wiederfinderaten (s. Tab. 8).

Eventuell vorhandene Aktivitätsunterschiede der beiden LBI-Präparate scheiden als Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse aus, denn auch mit 0,1% LBI der Fa. Worthington betrug die

Wiederfindung bei -15°C in den Seren M. (Hx-Serum) und Q. (Normalserum) nur 27 bzw. 47%. Der Grund hierfür kann folglich nur eine der Zeitdauer des flüssigen Zustandes proportionale Inaktivierungsquote des zugefügten ACTH sein (durch proteolytische Enzyme und eventuell durch einen "ACTH-binding factor" (14)).

Auch bei sofortigem Einfrieren der Proben bei -80°C bzw. sofortigem Inkubationsbeginn nach dem Mischen von Standard und Serum fand also eine ACTH-Inaktivierung statt, denn nur ca. 80% wurden wiedergefunden. Ausserdem konnte auch unter diesen Bedingungen in 4 Normalseren keine endogene ACTH-Aktivität gemessen werden. Wie sich in späteren Untersuchungen herausstellte, konnte dies aber nur zu einem geringen Teil durch eine ACTH-Zerstörung bedingt sein (siehe 4.1.4.).

Bei Versuchen mit 0,2% LBI lagen die wiedergefundenen ACTH-Werte geringfügig höher als bei 0,1% LBI (abgelesen jeweils an der entsprechenden Eichkurve mit gleich hoher LBI-Konzentration). Wurden exogenes bzw. endogenes ACTH im Serum zu verschiedenen Inkubationszeiten jeweils an der zeitlich entsprechenden h-ACTH₁₋₃₉-Eichkurve abgelesen (Versuche mit 0,1% LBI und ohne Trasylol^R), so was bei allen Seren ein deutlicher Abfall der gemessenen ACTH-Konzentration mit zunehmender Inkubationszeit zu erkennen (siehe Tab. 8). Die Corticosteronproduktion von ACTH-Standards nahm mit zunehmender Zeit also stärker zu als bei den Seren. Untersucht man den zeitlichen Verlauf der Corticosteron-Produktion dieser Seren, so ergab sich keine initiale Verzögerungsperiode wie bei h-ACTH₁₋₃₉-Standards. Andererseits war die relativ höhere Wirkung dieser Seren in den ersten 30 min. deutlich geringer als bei ACTH₁₋₂₃-Standards.

Durch LBI-Erhöhung und Trasylol^R-Zusatz zu den Serumproben verringerte sich die Diskrepanz zwischen den verschiedenen Inkubationszeiten; so waren z.B. bei 0,2% LBI + 70-80 KIE Trasylol^R in 2 Seren der 120 min. Werte sogar etwas grösser als der bei 30 min., in einem weiteren Serum geringfügig kleiner.

Tab. 8: Aktivität von exogenem und endogenem ACTH im Serum in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.
Die Werte wurden jeweils an der h-ACTH₁₋₃₉-Eichkurve mit gleicher Inkubationszeit und gleicher LBI-Konzentration abgelesen.

Serum-Vol.	pg ACTH zugesetzt	LBI-Konz. in %	Trasylol ^R - Zusatz in KIE	pg ACTH erhalten bei Inkub.dauer von min.			
				30'	70'	120'	180'
10 µl L.		0,1		58	46	46,5	
10 µl L.		0,1		37			34
10 µl L. + 90 µl M.		0,1		61	53	42	35
10 µl L. + 90 µl M.		0,1	50	61			40
10 µl L. + 90 µl M.		0,1	100	55			55
50 µl E.		0,1		33			28,3
90 µl M.	100	0,1		80	61	53,2	
90 µl X.	50	0,2	70	29,5		36,8	
100 µl Z.		0,2	80	27,5		30	
90 µl B.		0,2	70	82,5		74,5	

Auch diese Ergebnisse lassen sich am ehesten dadurch erklären, dass proteolytische Enzyme eine ACTH-Zerstörung mit zunehmender Inkubationszeit bewirken.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Wiederfindung von exogenem ACTH im Serum abhängig ist vom endogenen ACTH-Spiegel, von der Zeitdauer des flüssigen Zustandes und davon, ob Proteasen-Inhibitoren sofort zugefügt werden. Zum Teil sind diese Beziehungen sicher durch proteolytische Aktivitäten im Serum bedingt.

4.1.4. Einfluss der Serumproteine und des pH-Wertes
in der ACTH-Lösung.

4.1.4.1. ACTH-Standards mit verschiedenen Albumin-
Konzentrationen und pH-Werten.

Auf der Suche nach Hemmfaktoren der ACTH-Aktivität im Serum untersuchten wir zunächst das Albumin.

Hierzu verwendeten wir in den Standards neben der üblichen BSA-Konzentration von 0,5% noch verschiedene andere BSA- bzw. HSA-Konzentrationen zwischen 0,002% und 4%. Der pH-Wert in den Standardlösungen wurde jeweils auf 3,5 eingestellt. In der Zellsuspension wurde die BSA-Konzentration konstant bei 0,5% belassen. Die Leerwerte (= Zellsuspension mit Standard-Lösungsmittel und ohne ACTH) waren nach der 2-stündigen Inkubation bei allen Lösungsmitteln gleich hoch, d.h. auch die 4%igen BSA- bzw. HSA-Lösungen enthielten keine ACTH-Aktivität; auch waren in keinem der Lösungsmittel fluoreszierende Substanzen nachzuweisen, wie Kontrollmessungen bei der Corticosteronbestimmung ergaben.

Mit zunehmender Albuminkonzentration werden die Eichkurven steiler, Empfindlichkeit und maximale Corticosteron-Produktion erhöhen sich. Wie in verschiedenen Versuchen ermittelt wurde, verhalten sich hierbei BSA und HSA prinzipiell gleich (Abb.11).

In weiteren Versuchen veränderten wir bei 0,5% bzw. 4% BSA den pH-Wert (Abb.12).

Bei fast neutralen ACTH-Standardlösungen (pH = 7,12) fiel die Aktivität gegenüber der Normal-Eichkurve (0,5% BSA-pH 3,5) ab, jetzt aber bei 4% BSA sogar stärker als bei 0,5%. Die Eichkurven mit 4% BSA-pH 2,4 bzw. 1,4 verliefen geringfügig flacher als die Normal-Eichkurve.

In Abb. 13 ist die Abhängigkeit des Corticosteronanstieges vom pH-Wert über einen grösseren pH-Bereich für 100 pg ACTH und 4% bzw. 0,5% Albumin wiedergegeben.

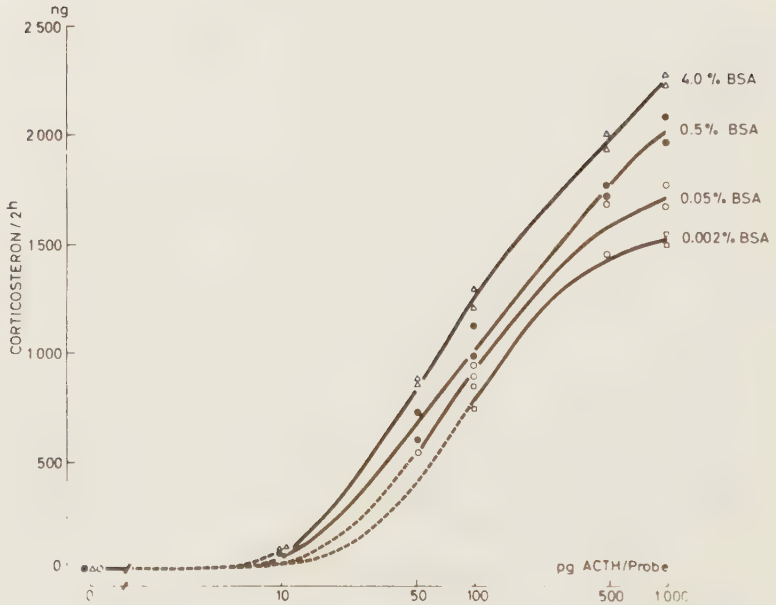


Abb. 11: ACTH₁₋₂₃-Eichkurven mit Standardlösungsmitteln von 0,002% bis 4% BSA und pH 3,5. Die Eichkurven werden mit zunehmender Albuminkonzentration steiler.

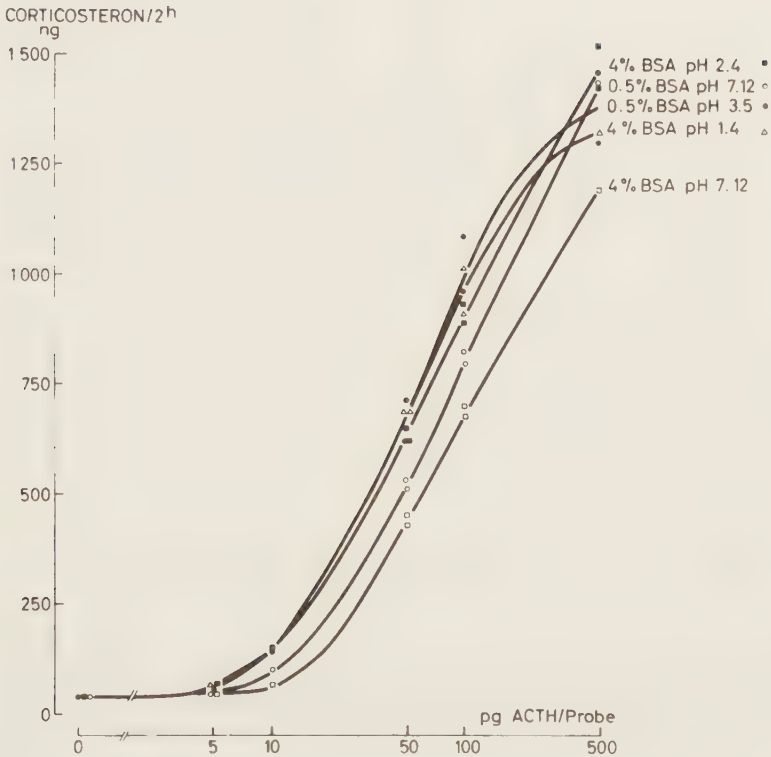


Abb. 12: h- ACTH_{1-39} -Eichkurven mit Standardlösungsmitteln von 0,5% und 4% BSA und verschiedenen pH-Werten.

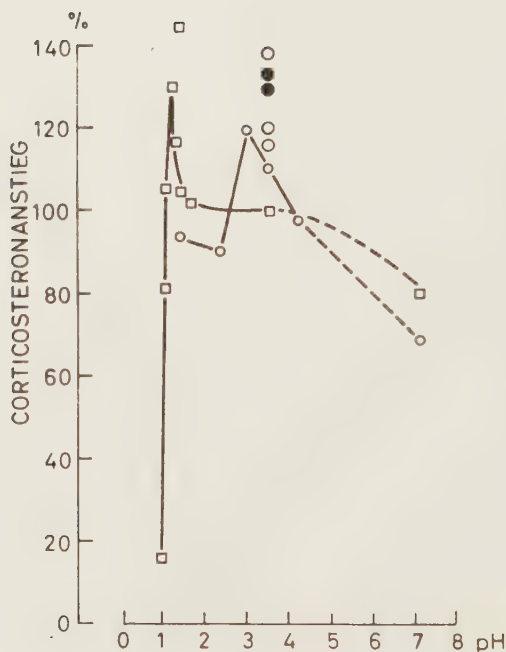


Abb. 13: Abhängigkeit des Corticosteronanstiegs von pH-Wert und Albuminkonzentration des Standardlösungsmittels. Es wurden je 100 pg h-ACTH₁₋₃₉ eingesetzt. Der Corticosteronanstieg bei 0,5% BSA-pH 3,5 wurde gleich 100% gesetzt.

- = 0,5% BSA
- = 4% BSA
- = 4% HSA

Der Corticosteronanstieg mit 0,5% BSA-pH 3,5 wurde gleich 100% gesetzt und die anderen Werte entsprechend berechnet. Nur die durch Striche verbundenen Werte wurden jeweils im selben Experiment bestimmt. Wie die Mehrfachbestimmungen mit 4% BSA-pH 3,5 zeigen, war der Corticosteronanstieg von Versuch zu Versuch etwas unterschiedlich. Das pH-Optimum liegt für 4% BSA zwischen 3 und 3,5, für 0,5% BSA etwa bei 1,2. Stärkeres bzw. geringeres

Ansäuern der Standardproben hat jeweils eine Aktivitätsabnahme zur Folge. Bei dem von SAYERS angegebenen Standardlösungsmittel (0,5% BSA-pH 3,5) sind also keineswegs die optimalen Versuchsbedingungen gewählt.

Andererseits scheint zwischen pH 3 und 4,5 für 0,5% BSA ein Plateau mit etwa gleicher Aktivität zu bestehen, was für die Vergleichbarkeit der Werte unter Berücksichtigung geringgradiger unvermeidlicher pH-Schwankungen von Bedeutung sein kann. Der jeweilige Aktivitätsabfall links des pH-Optimums, d.h. bei noch niedrigeren pH-Werten (siehe Abb.13), dürfte durch eine Schädigung der Nebennierenzellen in dem sauren Milieu bedingt sein.

Nicht eingezeichnet in Abb. 13 sind Einzelbestimmungen mit 100 pg ACTH in Albumin-freiem Lösungsmittel. Es ergab sich bei pH 3,5 ein Corticosteronanstieg von $80 \pm 5\%$ ($N = 2$) und bei pH 1 von $124 \pm 7\%$ ($N = 2$), d.h. das pH-Optimum dieses Lösungsmittels liegt offensichtlich noch weiter im sauren als bei 0,5% BSA.

Nur weil die Eichkurven mit 4% Albumin in Abb.11 näher am pH-Optimum lagen als diejenigen mit weniger Albumin, waren sie steiler. Niedrigere Albuminkonzentrationen in der Standardlösung haben also eine Verschiebung des pH-Optimums in Richtung "sauer" zur Folge. Der Grund dafür könnte in der geringeren Pufferkapazität der Standardlösung und der dadurch bedingten geringeren pH-Verschiebung in der Zellsuspension zu suchen sein; d.h. entscheidend für die ACTH-Aktivität wäre der pH-Wert des Inkubationsgemisches und nicht der des Standardlösungsmittels. pH-Messungen im Inkubationsgemisch während der Inkubation bei Verwendung der verschiedenen Standardlösungsmittel unterstützen diese Annahme: Mit 4% BSA-pH 3,5 ergab sich ein pH von 7,21 im Inkubationsgemisch, mit 0,5% BSA-pH 3,5 ein pH von 7,4 und mit 0,5% BSA-pH 1,2 ein pH von 7,05.

Die wahrscheinlichste Erklärung für die Abhängigkeit der ACTH-Aktivität von Albuminkonzentration und pH-Wert ist die unterschiedliche Beeinflussung eines inaktiven ACTH-Anteils (= proteingebunden ? siehe Kap. 4.1.5.). Andererseits ist als Ursache

hierfür eine unterschiedliche Beeinflussung folgender Faktoren nicht auszuschliessen:

- a) Der Glasadsorption des ACTH;
- b) der proteolytischen Enzyme, deren pH-Abhängigkeit bekannt ist (81);
- c) der Corticosteronproduktion in den Nebennierenzellen. Dabei müssten sich die Corticosteronwerte bei einer Änderung von pH-Wert bzw. Proteinkonzentration zu allen Inkubationszeiten gleichmässig verändern. Das entgegengesetzte Verhalten bei pH-Senkung (siehe Tab. 11) spricht aber gegen dieses Argument.

Unter Berücksichtigung der pH-Wirkungskurven kann in diesem Assay nicht von einer Schutzfunktion höherer Albuminkonzentrationen für ACTH gesprochen werden, wie aus Abb. 11 zunächst fälschlicherweise interpretiert werden könnte. Im Gegenteil, es muss sogar eine Hemmwirkung höherer Albuminkonzentrationen angenommen werden, da bei diesen die ACTH-Aktivität sowohl im neutralen pH-Bereich absinkt (Bindung ?) als auch im stark sauren pH (z.B. pH = 1,4) niedriger ist als bei geringeren Albuminkonzentrationen (Zerstörung der Zellsuspension ?).

Ähnliche Ergebnisse fand SAYERS (68). Er verdünnte die Zellsuspension mit verschiedenen Albuminpuffern, d.h. die Albuminkonzentration bei neutralem pH wurde verändert. Eine gewisse BSA-Menge (0,5%) in der Zellsuspension war für eine optimale Corticosteronproduktion notwendig, aber höhere Konzentrationen bewirkten eine zunehmende Hemmung. So nahm die Corticosteronsynthese in der folgenden Reihenfolge ab: 0,5% - 2% - 3% - 0% BSA. Dieses Resultat ist mit unseren Befunden vergleichbar bei Zusatz von höheren Albuminkonzentrationen zu Standardlösungen mit neutralem pH.

4.1.4.2. Hemmung der ACTH-Aktivität durch elektro-phoretisch aufgetrennte Plasmaproteine.

Die Untersuchung des Einflusses menschlicher Plasmaproteine bereitete enorme Schwierigkeiten. Zwar zeigten alle elektro-phoretisch aufgetrennten Proteinfractionen ⁺⁾ eine ihrer Ei-

⁺⁾ Für die Durchführung der elektrophoretischen Auftrennung der einzelnen Eiweissfraktionen danken wir Herrn PD. Dr. A.Fateh-Moghadam und Mitarbeitern von der I. Med.Univ.Klinik München.

weisskonzentration proportionale Hemmung der Corticosteronproduktion (auf 26-86%), doch war diese Wirkung zunächst nicht eindeutig vom hemmenden Einfluss des Veronalpuffers (pH = 8,7) abzutrennen, mit dem die Elektrophorese durchgeführt wurde. Deshalb reinigten wir die einzelnen Fraktionen säulenchromatographisch (auf Sephadex G-25 fine, 5 ml Säulen; Elutionsmittel: 0,9% NaCl-0,1 N HCl). Dann gaben wir zu jeder Fraktion 50 pg ACTH hinzu und untersuchten die Wiederfindenquoten im IAC-Assay. Im Elutionsmittel bewirkte diese ACTH-Menge einen Corticosteronanstieg, der 65 pg ACTH im Standardlösungsmittel entsprach (zum Einfluss von pH- und Protein-Veränderungen s.Kap. 4.1.4.1.). Um eine bessere Vergleichsmöglichkeit zwischen den einzelnen Fraktionen zu erhalten, wurde der Corticosteronanstieg im Elutionsmittel gleich 100% gesetzt.

In den verwendeten Konzentrationen (siehe Tab. 9) zeigten Albumin, α_1 , α_2 eine deutliche Hemmung der Corticosteronproduktion, bei α_2 und β lag sie dagegen innerhalb der Schwankungsbreite der Einzelwerte. Die stärkste Hemmfunktion ergab das unverdünnt eingesetzte Plasma.

Es sei darauf hingewiesen, dass die angegebenen Werte nur für die jeweils eingesetzte Proteinkonzentration und nur bei pH 1 gelten. Zur genaueren Charakterisierung der Hemmwirkungen müssten für jede Proteinfraction - ähnlich wie für Albumin (siehe Abb. 11, 12, 13) - ACTH-Wirkungskurven in Abhängigkeit von pH-Wert und Eiweisskonzentration aufgezeigt werden. Nur wenn bei gleicher Eiweisskonzentration und gleichem pH Aktivitätsunterschiede über einen grösseren pH-Bereich auftreten, sind spezifische hemmende Einflüsse einzelner Proteinfractionen endgültig gesichert.

Die vorliegenden ersten Ergebnisse lassen sich am ehesten mit einer unspezifischen Hemmung der ACTH-Aktivität in zumindest drei Fraktionen erklären.

Tab. 9: IAC-Assay: Corticosteronanstieg auf eine konstante h- ACTH_{1-39} -Menge im Normal-Plasma, in seinen elektrophoretisch gewonnenen Eiweissfraktionen und im Elutionsmedium.

Der pH-Wert des Plasmas betrug 7,7; bei allen anderen Proben lag er zwischen 1 und 1,07. Die Corticosteronproduktion im Elutionsmittel wurde gleich 100% gesetzt und die andern Werte entsprechend berechnet. Angegeben sind jeweils $\bar{x} \pm s$ (Die pipettierten Proben wurden bei -80°C aufbewahrt).

Zusatz (je 90 μl)	Protein-Konz. in g%	ACTH gefunden in pg	Corticosteron- produktion in %	N
Elutions- mittel	0	$65,0 \pm 5,1$	$100 \pm 5,3$	3
Plasma ⁺⁾	7	$37,1 \pm 2,1$	$61,2 \pm 4,5$	2
Albumin	1,33	$43,9 \pm 2,0$	$73,2 \pm 3,7$	2
α_1	0,2	$49,9 \pm 3,5$	$82,3 \pm 5,0$	2
α_2	0,69	$57,1 \pm 3,6$	$91,1 \pm 3,7$	2
β	0,66	$59,4 \pm 2,2$	$93,8 \pm 2,3$	2
γ	0,78	$46,0 \pm 1,6$	$76,5 \pm 3,0$	2

⁺⁾ Das Plasma bewirkte ohne zugesetztes ACTH keine Corticosteronproduktion.

4.1.4.3. Endogenes und exogenes ACTH im Serum bei verschiedenen pH-Werten.

Die folgenden Untersuchungen sollten zeigen, wie sich endogenes und exogenes ACTH im menschlichen Serum bei verschiedenen pH-Werten verhalten.

Die Seren wurden mit 1 N HCl - bzw. mit 0,1 N HCl, was ähnliche Ergebnisse brachte - unter Schütteln auf den gewünschten pH-Wert gebracht. Die Corticosteronproduktion bei den Seren mit physiologischem pH wurde gleich 100% gesetzt.

Ausser dem Normalserum X., das keine Corticosteronsynthese bewirkte, ergaben alle Seren ein Aktivitätsmaximum zwischen pH 3,8

Tab. 10: ACTH-Aktivität in Seren mit hohen endogenen oder exogenen ACTH-Spiegeln in Abhängigkeit vom pH-Wert der Seren. Um eine bessere Vergleichsmöglichkeit mit den ACTH-Standards (s.Abb.13) zu erhalten, wurde der Aktivitätsanstieg bei pH-Senkung auf die Corticosteronproduktion bezogen, wobei die Corticosteronproduktion bei physiologischem pH gleich 100% gesetzt wurde. Da es sich z.T. um verschiedene Seren derselben Patienten handelt, ist in Klammer jeweils das Datum der Blutentnahme angegeben.

Exp.	Serum	Vol.ein- gesetzt µl	ACTH bei phys.pH pg	HCl-Zusatz pH	ACTH pg	Corticost.prod.in % (Wert b.phys.pH=100%)
25.3	Z.(7.)	50	17,3	3,56	24	144
3.4	Z.(7.)	100	30,0	2,25	50,5	148
3.4	Z.(13.)	90	50,2	1,6	48	96
				1,4	14,8	17
				1,2	2,5	<1
16.4	Z.(13.)	100	78,5	3,35	97,8	121
				3,0	79,2	105
				2,56	87,2	112
				1,95	66,4	92
				1,75	33,4	56
25.3	B.(7.)	100	149	2,2	360,0	116
16.4	B.(11.)	100	17	3,4	18,0	102
				3,1	25,4	147
				2,5	27,4	159
				1,94	19,0	105
				1,6	26,8	148
25.3	B.(15.)	50	28,2	3,56	72,1	177
25.3	B.(15.)	100	68,5	4,55	52,5	93
				3,57	55,0	90
				3,0	92,5	136
				1,9	330,0	180
3.4	B.(15.)	60	40,2	3,4	47,1	117
		90	74,5	1,55	48,2	119
				2,6	95,0	116
				1,4	19,3	22
				1,2	7,0	2
3.4	K.(4.)	100	7,0	2,24	13,7	275
				2,0	14,3	273
				1,76	12,5	225
3.4	L.(11.)	100	32,0	3,4	54,0	133
				2,97	76,1	174
				2,3	61,7	150
				1,86	48,2	124
27.3	X.(9.)	100	0	1,15-3,4	0	0
3.4	X.(9.)+ 50 pg ACTH	90	39,1	2,6	64,2	153
				1,9	61,0	147
				1,6	67,1	158
				1,4	30,1	79
16.4	X.(9.)+ 50 pg ACTH	100	42,0	3,85	86,0	204
				2,98	77,6	178
				2,5	68,5	154
				2,0	96,4	194
				1,66	99,4	199

und pH 1,6. Es war von Serum zu Serum verschieden hoch (116-275%). Der durchschnittliche Corticosteronanstieg im Aktivitätsmaximum auf $165 \pm 48\%$ ($N = 10$) war etwa so gross wie die Steigerung bei den Standards im pH-Optimum gegenüber neutralen Bedingungen ($156 \pm 8\%$; $N = 5$). Bei einigen Seren ergaben sich 2 Aktivitätsgipfel (bei verschiedenen pH-Werten), siehe Tab. 10.

Da bei den Seren mit physiologischem pH ungünstigere Versuchsbedingungen gewählt sind (siehe Abb. 12 und 13) als bei der Normal-Eichkurve, an der erstere abgelesen werden, resultieren daraus etwas zu niedrige ACTH-Werte. Dies dürfte auch die verringerte Wiederfindung von exogenem ACTH (siehe 4.1.2.) teilweise erklären. Diese Faktoren erklären allerdings nur zum geringsten Teil das Phänomen, dass mit diesem Bioassay im Serum zu wenig ACTH-Aktivität gefunden wird (siehe Kap. 4.1.1. und 4.2.3.).

Zur weiteren Charakterisierung des pH-Einflusses überprüften wir, in welchem Zeitabschnitt während der Inkubation die Aktivitätssteigerung durch erniedrigte pH-Werte eintritt. Hierzu untersuchten wir die beiden Seren Z. und B., die auf verschiedene pH-Werte zwischen 7,7 und 1,4 titriert waren, neben der normalen Inkubationszeit von 2 Stunden auch nach 30 min. Inkubation (Tab. 11).

Überraschenderweise waren nach 30 min. die ACTH-Werte aller angesäuerten Seren deutlich niedriger als bei den Seren mit physiologischem pH-Wert (im pH-Optimum z.B. um 22,5 bzw. 19%); gegenüber den 2-Stunden-Werten mit jeweils gleichem pH war der Aktivitätsabfall noch grösser. Das heisst, bei erniedrigten pH-Werten tritt in den ersten 30 min. eine Aktivitätshemmung ein, und erst zwischen der 30. und 120. min. kommt es im pH-Optimum zu einer Aktivitätssteigerung, die allerdings weit grösser ist als die initiale Hemmung.

Tab. 11: Aktivität des endogenen ACTH in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Inkubationsdauer.
Die ACTH-Werte wurden jeweils an Eichkurven mit gleicher Inkubationszeit abgelesen. Die Versuche wurden mit 0,2% LBI und 80 KIE Trasylol/100 µl Serum durchgeführt.

Patient	Serum-Vol. eingesetzt µl	pH-Wert	pg ACTH bei Inkubations- dauer von	
			30 Min.	120 min.
Z.	100	7,7	27,5	30,0
Z.	100	2,25	22,3	50,5
B.	90	7,7	82,5	74,5
B.	90	2,6	64,0	95,1
B.	90	1,9	37,1	68,3
B.	90	1,4	9,0	19,3

4.1.5. Diskussion zur Richtigkeit der Serumbestimmungen im IAC-Assay.

SAYERS berichtet von einer vom zugesetzten Plasmavolumen abhängigen inhibitorischen Wirkung bei Plasmabestimmungen (69): Plasmavolumina zwischen 5 und 20 µl zeigten einen der Eichkurve entsprechenden Verlauf, dagegen fiel bei 50 bis 200 µl die ACTH-Aktivität gegenüber der Eichkurve immer mehr ab. Nach der Interpretation von SAYERS gibt es bei den kleinen Plasmavolumina keinen Anhalt für einen inhibitorischen Faktor, er ist aber eindeutig vorhanden bei 50 µl und mehr. Dagegen konnten wir in 6 Seren bzw. Plasmen eine Parallelität zur Standard-Eichkurve bis zu 100 µl, in einem Serum sogar bis zu 200 µl, nachweisen. Offenbar war in unseren Versuchen bei allen verwendeten Serum- bzw. Plasmavolumina - auch bei den kleinen Volumina zwischen 5 und 20 µl - ein gleichbleibender Anteil des endogenen ACTH aktiv; es ist allerdings nicht anzunehmen, dass 100% aktiv sind, denn unter gleichen Bedingungen wurden vom exogenen Standard nur ca. 80% wiedergefunden und in keinem der untersuchten Normalseren - trotz genügender Empfindlichkeit der Eichkurve - ACTH-Aktivität festgestellt. Durch Untersuchungen mit exogenem

und endogenem ACTH im Serum sowie mit verschiedenen Standardlösungsmittele konnten wir nachweisen, dass die ACTH-Aktivität im Serum zumindest durch folgende Faktoren gehemmt wird:

1. Proteolytische Enzyme
2. Lange Aufbewahrungszeit der flüssigen Proben
3. Lange Inkubationszeit
4. Den relativ hohen pH-Wert in den Serumproben
(= physiologisch)
5. Eine - wahrscheinlich unspezifische - Hemmwirkung durch verschiedene Serumproteine

Die zuletzt genannte Hemmwirkung durch verschiedene (elektrophoretisch aufgetrennte) Serumproteine spricht ebenso wie die Hemmwirkung von höheren Albumin-Konzentrationen und der Seren mit physiologischem pH für eine Bindung (und damit Inaktivierung) des ACTH durch Serumproteine. Die pH-Abhängigkeit könnte dabei durch eine Beeinflussung des Gleichgewichtes zwischen Protein-ACTH-Komplex und freiem ACTH zustande kommen, d.h. dass z.B. bei einer Erniedrigung des pH-Wertes der freie (= aktive) ACTH-Anteil zunimmt. Eine zu starke Senkung des pH-Wertes dürfte allerdings zu einer Schädigung der Nebennierenzellen im Inkubationsgemisch führen und dadurch den Abfall der Corticosteronproduktion bei sehr niedrigem pH verursachen (siehe Abb. 13). ESPINOZA et al. berichteten von stark erhöhten ACTH-Werten im angesäuerten Plasma gegenüber unbehandelten Proben. Zunehmende Plasmavolumina (pH zwischen 2 und 3,5) zeigten bei ihnen einen der Eichkurve parallelen Verlauf (13); auch war die Wiederfindung von exogenem Standard in diesem Plasma vollständig. Nach unseren Ergebnissen ist es aber unzulässig, Plasmaproben im Bereich des pH-Optimums einzusetzen und deren ACTH-Werte dann an der Normal-Eichkurve abzulesen; denn die beiden Lösungsmittel haben völlig unterschiedliche ACTH-Aktivitäten zur Folge (siehe Tab. 10 und Abb.13). Unter Nichtbeachtung dieser Unterschiede würden wir in 2 Seren - je nach pH-Wert - bis zu 199 bzw. 134% des zugefügten ACTH wiederfinden (siehe Tab. 10). Bei entsprechender Änderung von pH-Wert und Proteinkonzentration im Standard-Lösungsmittel würde auch die Empfindlichkeit der Eichkurve ansteigen, sodass

die Serum-ACTH-Werte etwa gleich bleiben bzw. nur gering ansteigen würden. Beim Ansäuern der Proben kommt noch die Schwierigkeit hinzu, dass für kein Serum der Verlauf der ACTH-Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert vorhergesehen werden kann, denn wie oben gezeigt, ergeben sich von Serum zu Serum beträchtliche Unterschiede. Die aufgezeigten Probleme bei der Serumbestimmung sind also keineswegs durch einfaches Ansäuern der Seren zu umgehen, wie ESPINOZA et al. behaupten. Eine Proteinbindung von ACTH würde auch die enorm grosse inhibitorische Kapazität des Serums erklären (nur bei extrem hohen endogenen bzw. exogenen ACTH-Spiegeln konnten Wiederfinderaten von nahezu 100% erreicht werden, siehe Abb. 9 und 10).

Es dürfte zumindest teilweise ein Zusammenhang zwischen den(m) oben beschriebenen Störfaktor(en) und dem postulierten "ACTH inhibitory factor", SAYERS (24, 69), bzw. "binding factor", FEHM (14, 15), bestehen. SAYERS und FEHM machen für die unvollständige Wiederfindung bzw. die ACTH-Hemmung im Plasma die genannten Faktoren verantwortlich.

Im Gegensatz zu den Befunden von SAYERS ist aber bei uns auch in kleinen Serumvolumina eine Hemmwirkung vorhanden. Wie in Kap. 4.3.1.4. näher beschrieben, konnte FEHM in radiochromatographischen Untersuchungen und in Extraktionsversuchen eine "binding activity" des Plasmas nachweisen. Sie war durch niedrige pH-Werte zu verhindern. Dies passt insofern gut zu unseren Ergebnissen, da nämlich bei niedrigem pH - wahrscheinlich wegen der verstärkten Dissoziation des Protein-ACTH-Komplexes - die ACTH-Aktivität zunimmt.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen fanden KITABCHI et al. keine Hemmung der ACTH-Aktivität bei Plasmazusatz; die Wiederfinderquoten betrugen 102,9 bzw. 106% (32).

Bei unseren Untersuchungen zum pH-Optimum fällt auf, dass für die verschiedenen BSA-Konzentrationen jeweils ein fixiertes schmales pH-Optimum besteht, während bei den Seren das Optimum bei verschiedenen pH-Werten liegt, sich z.T. über grosse pH-

Bereiche erstreckt, in einigen Fällen einen 2-gipfligen Verlauf zeigt und dass der maximale Corticosteronanstieg recht unterschiedliche Ausmasse annimmt. Als Ursache für diese Diskrepanzen kommen in Frage:

- a) Unterschiedliche Konzentrationen an Hemmfaktoren (z.B. ACTH-bindende Proteine);
- b) eventuell das Vorliegen verschiedener ACTH-Formen (97, 99).

Aus den Ergebnissen in 4.1.1. - 4.1.4. ergeben sich folgende Konsequenzen für den Assay:

1. Der flüssige Zustand der Proben, besonders der Seren, muss vor der Inkubation möglichst kurz sein, damit die Aktivitätsverluste weitgehend vermieden werden.
2. Als ACTH-Lösungsmittel können verwendet werden
 - a) verschiedene Albumin-Konzentrationen (zwischen 0 und 4%, eventuell noch höher) im jeweiligen pH-Optimum. Vorteil: Steile Eichkurve, grosse Empfindlichkeit.
 - b) 0,5% BSA-pH 3,5. Vorteil: Geringe pH-Verschiebungen, die nie ganz zu vermeiden sein dürften, bewirken kaum eine Aktivitätsänderung (Plateau!). Im selben Assay und in Interassay-Bestimmungen sind folglich besser übereinstimmende Ergebnisse zu erwarten.
 - c) ACTH-freies Serum, pH = 7,4. Vorteil: Mit diesem Lösungsmittel sind - auf Grund der etwa gleichen Versuchsbedingungen bei Standards und unbekannten Serumproben - noch am ehesten die richtigen endogenen ACTH-Konzentrationen zu messen. Die Aufbewahrungszeit der flüssigen Proben darf aber nur ganz kurz sein, da sonst störende Inaktivitätsunterschiede auftreten.
Nachteil: Der Assay wird unempfindlicher. Durch pH-Senkung (pH ca. 3) könnte die Empfindlichkeit des Assays wieder gesteigert werden, jedoch je nach Serum in unterschiedlichem Ausmass (s.o.).
3. Zur direkten Bestimmung von Serumproben muss entweder, wie eben geschildert, die Standard-Eichkurve im Serum gemacht werden, oder aber die an der Normal-Eichkurve abgelesenen Serumwerte müssen mit jenem konstanten Faktor multipliziert werden, um den sie - nach Untersuchungen mit exogenem ACTH - zu niedrig sind, z.B. mit dem Faktor 1,25 bei einer Aufbewahrungstemperatur der Proben von - 80° C und einer

LEI-Konzentration von 0,2%. Wie in Kap. 4.1.3.2. gezeigt wurde, ist nur bei ganz kurzzeitigem flüssigem Zustand der Proben (z.B. bei sofortigem Einfrieren bei -80°C) eine genau erfassbare und damit berechenbare Abweichung gewährleistet. Für die Richtigkeit der durch diese Umrechnung erhaltenen ACTH-Werte auch für die endogenen Hormonkonzentrationen ist ein gleiches Verhalten von exogenem und endogenem ACTH Voraussetzung. Das ist aber eher unwahrscheinlich, da im Normalserum keine ACTH-Aktivität nachzuweisen war und - wie in Kap. 4.2.3. gezeigt wird - bei Patienten mit Nelson-Syndrom 2,5 - 10fach niedrigere Werte im IAC-Assay im Vergleich zum LN-Assay gemessen wurden.

4.2. Direkte Serumbestimmungen.

4.2.1. Patienten mit Nelson-Syndrom (LN-Assay).

Wir untersuchten im LN-Assay die Seren von 6 Patienten mit Nelson-Syndrom. Die ACTH-Spiegel wurden neben ihrem prä- und postoperativen Verlauf auch in ihrer Abhängigkeit vom Tagesrhythmus, auf Stimulierbarkeit (Insulinbelastung) und Hemmbarkeit (Dexamethason) untersucht (Tab.12).

Alter, Geschlecht und Krankheitsverlauf der Patienten sind der Tab. 12 zu entnehmen.

Alle Patienten wiesen stark bis exzessiv erhöhte ACTH-Spiegel auf. Sie lagen zwischen 0,19 und 117 ng/ml Serum.

Tab.12 (nächste Seite):

ACTH-Serumspiegel bei Patienten mit Nelson-Syndrom (LN-Assay). Die präoperative Blutabnahme erfolgte jeweils einige Tage vor der Hypophysenoperation.

Die mit + bezeichneten Werte wurden von W.PISTER (60) bestimmt.

Die Hypophysenbestrahlung erfolgte mit insgesamt 5000 rd Herddosis, die über 5 Wochen gleichmässig verteilt wurden.

Patient	Alter	Zeitpunkt d. Adrenalekt. (total-subt.)	Sella z.Ztp.Sellaver- d.Adrenal- gröss., ektomie erste,erfasst.	Zeitp.d. Hypophys.-Op. bzw.Bestr.
---------	-------	--	---	---

R.E. ♀	10.45	2.66 total	o.B.	70
--------	-------	------------	------	----

8.71 Op.(1)
8.72 Op.(2)

A.Li. ♀	5.35	5.64 total	o.B.	4.68
---------	------	------------	------	------

8.71 Op.

M.K. ♀	8.38	61 total	o.B.	67
--------	------	----------	------	----

R.H. ♂	6.26	11.71 total	leicht vergr.	11.71
--------	------	-------------	------------------	-------

4.72 Op.(1)

2.73 Op.(2)

3.73 Bestr.

M.T. ♀	8.39	1.72 subt.	o.B.	11.72
--------	------	------------	------	-------

A.La. ♀	2.47	1.71 total	o.B.	2.72
---------	------	------------	------	------

4.72 Op.

Zeitp.d.Blutentnahme f.ACTH-Bestimmung	Serum-Vol. eingesetzt in ml	gemess.ACTH- Spiegel in ng/ml	N
präop.(1) 6.00 nüchtern	1	15,01 + 1,59 ⁺	3
9.00	1	13,94 + 0,45 ⁺	3
45 min.nach Insulin (9.45)	1	13,13 + 0,68 ⁺	3
Nach 2 Tg.Dexam.(je 4x0,5 mg)			
6.00 nüchtern	1	11,40 + 0,64 ⁺	3
8 Wo.postop.(1) 6.00 nüchtern	1	14,78 + 0,85 ⁺	3
3 Wo.postop.(2) 6.00	1	22,04 + 3,51	3
	0,25	14,70 + 0,60	2
	0,1	20,9	1
10 Wo.postop.(2) 6.00	1	3,18 + 0,24	4
8 Mo.postop.(2) 6.00	1	29,48	1
	0,2	26,25 + 8,25	5
präop. 6.00 nüchtern	1	2,22 + 0,40 ⁺	3
9.00	1	2,31 + 0,26 ⁺	3
45 min.nach Insulin (9.45)	1	2,44 + 1,21 ⁺	3
8 Wo.postop. 6.00 nüchtern	1	1,98 + 0,13 ⁺	3
1 J.postop. 6.00 nüchtern	1	20,32 + 3,80	3
	0,2	18,65 + 3,85	2
1 3/4 J. postop. 9.00	1	(58,72)	1
	0,2	117,20 + 18,80	5
	0,5	88,65 + 20,68	2
6.00 nüchtern	1	2,81 + 0,28 ⁺	3
Nach 2 Tg.Dexam.(je 4x0,5 mg)			
6.00 nüchtern	1	2,03 + 0,08 ⁺	3
präop.(1) 6.00 nüchtern	1	0,60 + 0,08	3
8 Wo.postop.(1) 6.00 nüchtern	1	0,63 + 0,04	3
präop.(2) 7.30	1	1,71 + 0,41	2
	0,25	1,84 + 0,56	2
2 Wo.postop.(2) 9.00	1	0,68 + 0,17	5
	0,35	1,00	1
4 Wo.post Bestr. 9.00	1	0,99 + 0,09	4
	0,5	0,52	1
Nach 2 Tg.Dexam.(je 4x0,5 mg) 9.00	1	0,74 + 0,14	3
Nach 2 Tg.Dexam.(je 4x2 mg) 9.00	1	0,54 + 0,13	4
9.00	1	0,19 + 0,12	3
Nach 2 Tg.Dexam.(je 4x0,5 mg) 9.00	1	0,24 + 0,07	3
	0,2	0,15 + 0,10	2
Nach 2 Tg.Dexam.(je 4x 2 mg) 9.00	1	0,31 + 0,01	2
	0,5	0,34	1
	0,25	0,48	1
präop.6.00 nüchtern	1	13,25 + 8,88	3
	0,5	10,20	1
6 Wo.postop. 6.00 nüchtern	1	12,40 + 2,96	2

Eine Tagesrhythmik der ACTH-Ausschüttung konnte bei zwei Patienten nicht festgestellt werden (Vergleich der 6.00 Uhr- und der 9.00 Uhr-Werte von Patient R.E. und A.L.).

Auch liess sich die ACTH-Ausschüttung weder durch einen Stimulationsreiz (0,1 E Altinsulin pro kg KG, wobei der Blutzucker stets auf $< 40 \text{ mg \%}$ abfiel), steigern ($N = 3$), noch durch Dexamethason wesentlich supprimieren ($N = 4$), wobei auch die Schwankungsbreite der Werte in dieser Methode berücksichtigt werden muss (siehe Kap. 2.3.).

Diese Befunde sprechen für eine Sekretionsstarre der ACTH-produzierenden Hypophysenvorderlappenzellen beim Nelson-Syndrom (siehe Abb.14).

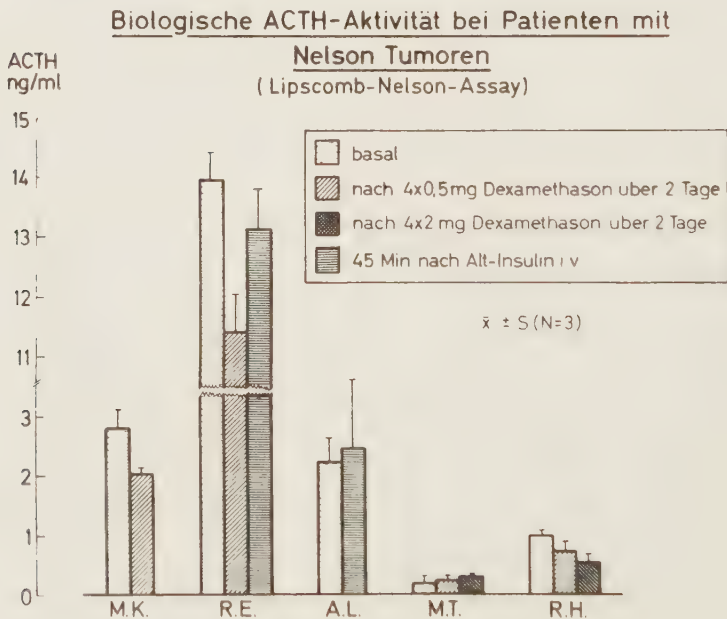


Abb.14: Weitere Einzelheiten im Text.

Auffallend war, dass bei keinem der Patienten der ACTH-Spiegel durch Hypophysektomie wesentlich gesenkt werden konnte. Damit werden die - schon bei der Akromegalie bekannten - Schwierigkeiten dokumentiert, hormonaktive Hypophysenvorderlappen-Tumoren operativ in ihrer Aktivität zu mindern bzw. auszuschalten. Dass das ACTH nach diesen Ergebnissen noch widerstandsfähiger als das STH zu sein scheint, ist u.a. auch schon aus der Pathophysiologie von hormoninaktiven Hypophysenvorderlappen-Tumoren zu verstehen, bei denen sehr viel häufiger die STH-Sekretion ausfällt als die von ACTH. Insgesamt muss selbstverständlich berücksichtigt werden, dass die Fallzahl für eine endgültige Aussage noch zu klein ist.

4.2.2. Andere Patienten mit erhöhten ACTH-Spiegeln (LN-Assay).

M.D.: Es handelt sich um eine 47-jährige Patientin mit primärer - wahrscheinlich idiopathischer - Nebennierenrinden-Insuffizienz. Die gemessenen ACTH-Serumspiegel lagen mit $1,92 \pm 0,99$ ng/ml ($N = 3$) bzw. $0,25 \pm 0,08$ ng/0,2 ml weit über dem Normalbereich und waren damit eine weitere Bestätigung der Diagnose.

B.L.: Der 42-jährige Patient wies die typischen Zeichen eines ektopischen ACTH-Syndroms auf (u.a.hypokaliämische Alkalose, starke Hyperpigmentation). Als Ursache war eine ektopische ACTH-Produktion in einem - histologisch gesicherten - undifferenzierten kleinzelligen Bronchial-Karzinom anzunehmen. Der ACTH-Serumspiegel war - wie zu erwarten - mit $1,25 \pm 0,24$ ng/ml ($N = 4$) stark erhöht.

Diese ACTH-Spiegel stimmen gut überein mit den von anderen Autoren (6, 40, 63) beschriebenen Werten bei solchen Krankheitsbildern. Da es sich bei unseren Untersuchungen nur um Einzelfälle handelt, die im Rahmen dieser Arbeit interessehalber mitgemessen wurden, wird auf eine ausführliche Darstellung der Krankheitsbilder und Diskussion der gemessenen ACTH-Spiegel verzichtet. Es sei auf die oben zitierten, umfassenden Arbeiten

von LIDDLE, RATCLIFF und BESSER verwiesen.

4.2.3. Vergleich der Ergebnisse von Serumbestimmungen im LN-Assay und im IAC-Assay.

Wie schon in Kap. 4.1.1. angeführt, konnten trotz ausreichender Empfindlichkeit im IAC-Assay niemals ACTH-Serumspiegel von Normalpersonen gemessen werden ($N = 15$). Die in den zahlreichen Versuchen mit dem IAC-Assay mitgelaufenen Seren von Patienten mit verschiedenen Krankheiten der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (siehe Tab. 13) ergaben ganz offensichtlich prinzipiell zu niedrige Werte; so z.B. für Patienten mit Morbus Addison (M.A. 40 pg/ml) oder nach beidseitiger Adrenalektomie wegen Cushing Syndrom (M.K. 14 pg/ml). Auch sind die Werte für Patienten mit Nelson-Syndrom im Schnitt sehr viel niedriger als beim LN-Assay (siehe Kap. 4.2.1.), nämlich zwischen 0,1 und 5,9 ng/ml, obwohl es sich z.T. um dieselben Patienten handelt.

Trotz dieses "Messfehlers" kann aber festgestellt werden, dass die in Tab. 13 untersuchten Seren gegenüber Normalseren stark erhöhte ACTH-Spiegel aufweisen. Etwas überraschend war der Befund bei Patientin E.B., bei der durch die Gabe von 4x2 mg Dexamethason oral 2 Tage lang der ACTH-Spiegel im IAC-Assay deutlich abfällt (nach Dexamethason: 0,16 ng/ml; Nüchternwerte: 1,1 und 1,5 ng/ml), allerdings ist dabei auch noch die gleichzeitig laufende Bestrahlungstherapie zu berücksichtigen. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den übrigen an Patienten mit Nelson-Syndrom - allerdings mit dem "richtig" messenden LN-Assay - erhobenen Befunden (siehe Kap. 4.2.1.).

Die Diskrepanz zwischen den ACTH-Serumwerten im IAC-Assay und im LN-Assay wird durch die Ergebnisse noch besser belegt, die wir mit 3 Seren von Patienten mit Nelson-Syndrom erhielten, bei denen praktisch gleichzeitig beide Assays durchgeführt werden konnten (zeitliche Diskrepanz zwischen den einzelnen Bestimmungen: 1 - 3 Tage, während denen die Seren in Aliquots bei -80°C eingefroren waren).

Der IAC-Assay wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:
 0,1% LBI, kein Trasylol^R, Aufbewahrungstemperatur des
 Versuchsansatzes bei - 15° C; die Versuchsbedingungen
 wurden deshalb so gewählt, da zum damaligen Zeitpunkt
 die dabei auftretenden Aktivitätsverluste von mindestens
 50% noch nicht untersucht und quantifiziert waren.

Tatsächlich ergaben sich im LN-Assay 7 - 30fach höhere Werte
 (siehe Tab. 14).

Tab.14: Vergleich der ACTH-Werte von 3 Seren im Lipscomb-Nelson-
Assay und im IAC-Assay. Die Seren stammen von Patienten
 mit Nelson-Syndrom.

Serum	LIPSCOMB - NELSON			ISOLATED ADRENAL CELLS		
	Vol. µl	N	ng/ml ACTH x ± s	Vol. µl	N	ng/ml ACTH x ± s
A.Li.	200	5	117,20±18,80	50	4	11,26±0,58
	50	2	88,65±20,68	10	2	14,50±0,90
R.E.	1000	1	29,48	50	2	0,91±0,01
	200	5	26,25± 3,90	10	2	0,79±0,12
R.H.	1000	2	1,71± 0,41	20	2	0,12±0,01
	250	2	1,84± 0,56			

Nach den von uns gemessenen unterschiedlichen ACTH-Werten bei
 verschiedenen Versuchsbedingungen (siehe Kap.3.3. und 4.1.)
 könnten allerdings die Werte des IAC-Assays bei günstigeren
 Bedingungen maximal um einen Faktor von 2,5 - 3 höher liegen.
 Trotzdem ist die Diskrepanz zwischen LN-Assay und IAC-Assay
 dadurch nicht erklärbar, sondern es verbleibt ein 2,5 - 10facher
 Aktivitätsunterschied.

Dieser Befund passt also gut zu den Ergebnissen, die mit Normal-
 seren im IAC-Assay erzielt wurden, wobei in keinem dieser Seren
 ACTH nachgewiesen werden konnte.

Es scheint also einen Faktor im Serum zu geben (Protein-Bindung ?), der die Corticosteronproduktion in vivo (LN-Assay) nicht beeinträchtigt, dagegen ganz erheblich bei den isolierten Nebennierenzellen des IAC-Assays in Erscheinung tritt (wahrscheinlich stellt er auch eine der Ursachen für die Schwierigkeiten im RIA dar).

Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass im LN-Assay dieser Störfaktor in gleich starker Weise bei ACTH-Standards und bei Serumproben wirksam ist. Das ist insofern möglich, als beide Proben sehr stark im Rattenblut verdünnt die Nebennieren erreichen und somit die inhibitorische Aktivität des Rattenblutes in jedem Fall bestimmend werden könnte. Auch ist ja die Empfindlichkeit des LN-Assays trotz direkter Injektion des ACTH in die Aorta und Sammeln des Nebennieren-Venenblutes nicht sehr hoch, was ebenfalls für eine ACTH-bindende Aktivität des Rattenblutes sprechen könnte.

4.3. ACTH-Extraktion aus dem Serum.

Ziel der folgenden Versuche war es, die Störfaktoren des Serums, die im IAC-Assay - und bei anderen Autoren auch im RIA - die ACTH-Werte falsch erniedrigen (siehe Kap. 1 und 4.1.), vom ACTH abzutrennen. Da weder deren Grösse noch Struktur bekannt sind, ist eine möglichst exakte Isolierung von allen Serumbestandteilen zu fordern.

Wir arbeiteten mit Quso G 32 und der Gelfiltration.

4.3.1. Gelfiltration.

4.3.1.1. Material und Methoden.

4.3.1.1.1. Verwendete Gele.

Sephadex Dextrangele: G-10, G-50 fine, G-75;
Fa. Pharmacia, Uppsala/Schweden

Bio-Gele (Polyacrylamid-Matrix): P-10, 100-200 mesh; P-6, 100-200 mesh;
Fa. Biorad, Richmond/USA.

Das jeweils verwendete Gel wurde in reichlich Aqua dest. aufgeschwemmt und 12 - 24 Stunden bei Zimmertemperatur zum Quellen stehen gelassen.

4.3.1.1.2. Elutionsmittel.

Wir verwendeten die folgenden 3 Elutionsmittel:

Elutionsmittel 1: Phosphat-Puffer 0,015 M in 0,9% NaCl-0,5% Mercaptoäthanol (pH = 7,4)

Elutionsmittel 2: ACTH-freies Serum 1:10 mit 0,9% NaCl verdünnt, 0,5% Mercaptoäthanol (pH = 8,4)

Elutionsmittel 3: 0,9% NaCl-0,1 N HCl mit 0,5 bzw. 0,2% Mercaptoäthanol

4.3.1.1.3. Säulen und Elutionstechnik.

Es wurden folgende Säulen verwendet:

20 x 1 cm Glassäulen

10 ml Plastikzylinder von Einmalspritzen;
Fa.Braun, Melsungen

5 ml Plastikzylinder von Einmalspritzen;
Fa.Braun, Melsungen.

Die zentrale Ausflussöffnung der Säulen wurde mit einer Glasmatte und einem Membranfilter (Fa.Sartorius, Göttingen) abgedeckt. Die Geloberfläche wurde ebenfalls mit einem Membranfilter abgeschlossen, um ein Aufwirbeln zu verhindern und eine glatte Oberfläche beizubehalten. Die Säulen waren mit Gummistopfen verschlossen, die für den Zufluss mit je einer Injektionskanüle ($\varnothing = 1,1$ mm) durchbohrt waren. Das Elutionsmittel lief von einem 6-15 cm höher gelagerten Vorratsgefäß über einen Schlauch ($\varnothing = 0,3$ cm) zur Kanüle der Säule. Die Säule stand also unter einem Druck von ca. 6-15 cm H_2O . Alle Säulen wurden vor Versuchsbeginn mit 1-2 ml ACTH-freiem Serum equilibriert.

Vor dem Auftragen der Proben wurde gewartet, bis das Elutionsmittel über dem Gel eingesunken war. Dann wurde vorsichtig mit einer Pipette die jeweilige Probe aufgetragen und nach deren Eindringen in das Gel dreimal 0,3 ml Elutionsmittel zugegeben. Anschliessend wurde die Säule mit dem Puffervorratsgefäß verbunden.

Die Eluate wurden mit Hilfe eines automatischen Proben-sammlers (Fa.Serva, Heidelberg) in Eppendorf-Reaktions-gefäßen gesammelt. Das Volumen der Fraktionen betrug je 0,38 ml, in einigen Versuchen 1 ml. Mit dem Sammeln wurde jeweils unmittelbar nach dem Auftragen der Proben begonnen. Wenn nicht anders erwähnt, wurden die Versuche bei Zimmer-temperatur (ca. 20° C) durchgeführt.

4.3.1.1.4. Markieren und Reinigen von ACTH⁺.

Wir verwendeten in geringfügiger Abänderung die von YALOW und BERSON (3, 95) modifizierte Methode nach HUNTER und GREENWOOD (29):

2 µg h-ACTH₁₋₃₉ wurden mit 1/2 bzw. 1 mCi ¹²⁵J markiert.

Dabei wurden die folgenden Substanzen nacheinander zu 20 µl 0,4 M Phosphatpuffer zugefügt:

ACTH, ¹²⁵J, 31 µg Chloramin T (in 10 µl 0,015 M Phosphatpuffer), ca. 3 sec. später 62 µg Na-Meta-bisulfit (in 20 µl 0,015 M Phosphatpuffer) und 1 ml ACTH-freies Serum.

Bei 1 mCi/2µg ACTH ist dann das ACTH mit etwa 1 ¹²⁵J-Atom pro Molekül markiert, unter der Voraussetzung eines reinen ¹²⁵J-Isotops und eines nahezu vollständigen Verbrauchs des ¹²⁵J (100). Mit 5 mg Quso G 32 wurde das intakte markierte Hormon aus dem Puffer extrahiert und somit von ¹²⁵J und Damage abgetrennt. Vom Quso wurde - nach Waschen mit 1 ml Aqua dest. - mit 0,7 ml 40% Aceton-1% Essigsäure eluiert. Die Weiterverdünnung auf die erforderliche Konzentration erfolgte mit verdünntem ACTH-freiem Serum (1:10 mit 0,9% NaCl - 0,5% Mercaptoäthanol). In den auf diese Weise markierten Standardpräparationen konnte in keinem der Chromatographie-Versuche (u.a. mit Sephadex G-50 fine) freies ¹²⁵J gefunden werden.

+) Versuche mit Dr.Dr. F. Erhardt und M.Ehbauer, II. Med. Univ. Klinik München.

4.3.1.1.5. Gewinnung von ACTH-freiem Serum.

ACTH-freies Serum war erforderlichlich zum Equilibrieren der Säulen und zum Verdünnen des ^{125}J -ACTH bzw. des Standards. Es wurde folgendermassen gewonnen:

Seren von mindestens 20 Normal-Patienten wurden gemischt und ca. 6 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Vor dem Auftragen auf die Säule wurde das Mischserum mit 2 N HCl verdünnt, bis auf eine Endkonzentration von 0,1 N HCl, das entsprach einem pH-Wert von etwa 3. Sollte die Trennung von Proteinen und ACTH untersucht werden, so wurden 50 μl ^{125}J -ACTH (das entsprach je nach Markierung 0,4 oder 3 ng ACTH) zu verschiedenen Volumina ACTH-freiem Serums-0,1 N HCl gegeben, 10 min. inkubiert und dann das Gemisch auf die Säule gebracht.

4.3.1.1.6. Proteinbestimmung.

Die Proteinbestimmung erfolgte im Photometer Eppendorf über die Absorption (Hg-Lampe) bei 280 nm. Zum Erstellen einer Eichkurve wurden verschiedene Albuminkonzentrationen verwendet (Albumin vom Rind, reinst, Fa. Behring, Marburg).

4.3.1.1.7. Zählen der radioaktiven Proben.

Die radioaktiven Proben wurden im "gamma guard 150" (Fa. ICN Tracerlab, Köln) unter folgenden Bedingungen gezählt:

Coarse Gain 64; fine Gain 1,4; Window 2,3; time present 0,2 bzw. 0,5 min.

Die Zählhausbeute betrug ca. 65%.

4.3.1.2. Vorversuche.

4.3.1.2.1. Vergleich verschiedener Elutionsmittel.

Es sollte zunächst geklärt werden, welches Elutionsmittel zur ACTH-Abtrennung aus dem Serum am besten geeignet ist. Abb. 15 zeigt die unterschiedlichen Chromatogramme von 3 Elutions-Puffern.



Abb. 15: Gelfiltration von 50 μ l 125 J-ACTH (ca. 3 ng) auf Sephadex Säulen (1 x 20 cm) mit verschiedenen Elutionsmitteln. Temperatur 4°C. Fraktion je 1 ml.

Δ = 0,9% NaCl-O,1 N HCl-O,5% Mercaptoäthanol auf Sephadex G-75
 □ = ACTH-freies Serum 1:10 verdünnt mit 0,9% NaCl-O,5% Mercapto-
 äthanol, pH 8,4; auf Sephadex G-50 fine
 ● = 0,015 M Phosphat-Puffer in 0,9% NaCl-O,5% Mercaptoäthanol,
 pH 7,4; auf Sephadex G-50 fine
 ○ = Proteinpeak beim Chymatogramm des Phosphat-Puffers;
 hierbei wurde das 125 J-ACTH in 1 ml Serum 10 min. inkubiert
 und dann mit dem Serum aufgetragen.

Ab Fraktion 74 wurde jeweils mit Elutionsmittel 3 (0,9% NaCl-O,1 N HCl-O,5% Mercaptoäthanol) eluiert.

Mit Phosphat-Puffer war keine vollständige Elution des ACTH von der Säule möglich; ein Teil blieb am Gel adsorbiert (ca. 13%). Der Haupt-Peak war verhältnismässig breit. Auch mit 1:10 verdünntem Serum konnte nicht alles ACTH wiedergewonnen werden, der adsorbierte Anteil war allerdings wesentlich kleiner. Untersuchungen auf Sephadex G-10 und Bio-Gel P-10 ergaben praktisch dasselbe Ergebnis. Andererseits war die Adsorption von ACTH an die verschiedenen Gele zu gering, um diese Möglichkeit der Gelfiltration zur Extraktion des ACTH aus dem Serum anzuwenden. Unsere Bemühungen konzentrierten sich deshalb auf die Ausnützung des Molekularsieb-Effektes dieser Gele. Mit 0,9% NaCl-0,1 N HCl war eine vollständige Elution des adsorbierten ACTH-Anteils möglich bzw. konnte die Adsorption verhindert werden. Wir verwendeten deshalb in den folgenden Versuchen ausschliesslich dieses Elutionsmittel. Bei allen Puffern ergab sich ein kleiner Vorpeak, der in der Proteinfraction mitlief (6. - 12. Fraction). Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um proteingebundenes ACTH (siehe 4.3.1.4.).

Um ein möglichst kleines Elutionsvolumen zu erzielen, verwendeten wir in den weiteren Experimenten kleinere Säulen (5 bzw. 10 ml).

4.3.1.2.2. Vergleich verschiedener Gele.

Die verschiedenen Gele sind u.a. charakterisiert durch ihr spezifisches Quellverhalten (water regain). Damit in Zusammenhang steht ihre Porengrösse. Moleküle, die grösser sind als die grössten Poren, fliessen zwischen den Gelpartikeln, dem sog. äusseren Volumen. Kleinste Partikel durchwandern zusätzlich das Gel (inneres Volumen), werden also stark verzögert und später eluiert. Dazwischen liegt der soq. "fractionation range" des Gels, in dem Moleküle je nach ihrer Grösse die Gelpartikel in unterschiedlichem Ausmass durchdringen. Diese Beziehung gilt ohne Einschränkung jedoch nur für den Idealfall,

d.h. für einen reinen Filtrationsvorgang ohne Adsorptionsphänomene. K_{av} , der Verteilungskoeffizient zwischen der flüssigen Phase und der Gelphase lässt sich nach folgender Gleichung berechnen:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_a}{V_t - V_a}$$

V_e = Elutions-Volumen

V_a = Äusseres Volumen

V_t = Äusseres und inneres Volumen

Wird in einem Diagramm K_{av} in Abhängigkeit vom Molekulargewicht aufgetragen, so erhält man für jedes Gel eine charakteristische Kurve. Für Teilchen, die im Ausschluss-Volumen eluiert werden, wird $K_{av} = 0$, für solche, die in zunehmendem Mass im inneren Volumen wandern, nähert sich K_{av} dem Wert 1 (36, 80). Zur Abtrennung einer Substanz mit einem bestimmten Molekulargewicht muss ein Gel verwendet werden, bei dem der zu diesem Molekulargewicht gehörende K_{av} im steilen mittleren Teil der Kurve liegt, d.h. die zu trennende Substanz befindet sich im "fractionation range".

Wir untersuchten und verglichen die Trennungsqualität der folgenden Gele (Versuche mit 5 ml Säulen und einem $^{125}\text{J-ACTH}$ -Serumvolumen von 100 - 500 μl):

Bio-Gele:

P-6	Wie die Abb.16 deutlich zeigt, verschlechtern zunehmende Serumvolumina die Trennung des ACTH von den Serumproteinen. Nur mit 100 μl Serum ergab sich praktisch keine Überschneidung der beiden Peaks. Der ACTH-Peak war sehr breit, d.h. es erfolgte eine starke Verdünnung.
P-10	ergab bei 300 μl Serum eine bessere Trennung als P-6; der ACTH-Peak war etwas schmaler, jedoch mit ca. 22 Fraktionen (= 8,4 ml) immer noch sehr breit (Verdünnung 1:28).

Sephadex Dextran-gele:

G-50	fine und G-75 ergaben praktisch gleiche Chromatogramme: Mit 300 bzw. 500 μl Serum war die Proteinabtrennung unvollständig, der ACTH-Peak war aber wesentlich schmaler als bei den
------	--

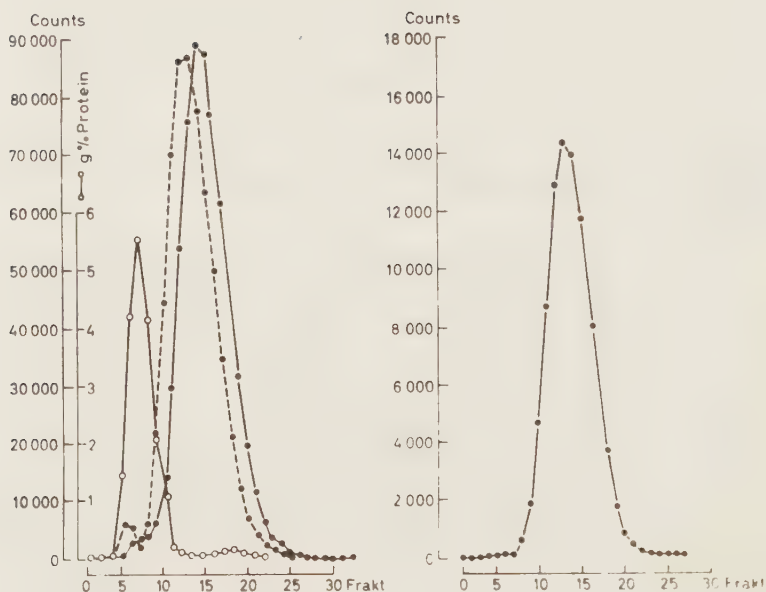


Abb.17: Gelfiltration von 3 ng ^{125}J -ACTH mit und ohne Serumzusatz (linke Abb.), sowie Rechromatographie von 200 μl (ca. 0,17 ng ACTH) der Fraktion 17 aus dem linken Chromatogramm mit Serum auf Sephadex G-75 (rechte Abb.); Säule: 5 ml; Elutionsmittel: 0,9% NaCl-0,1 N HCl-0,2% Mercaptoäthanol; Fraktion: Je 0,38 ml.

- Linke Abb.: ●---● = Gelfiltration ohne Serumzusatz, Zählzeit 0,2 min.
 ●—● = Gelfiltration mit Serumzusatz (500 μl), Zählzeit 0,2 min.
 ○—○ = Proteinpeak bei der Gelfiltration mit Serumzusatz
- Rechte Abb.: ●—● = Rechromatographie, Zählzeit 0,5 min.

der aufgetragenen Hormonmenge nicht ein wesentlich schmalerer ACTH-Peak und damit eine bessere Proteinabtrennung zu erzielen ist.

Dasselbe Ergebnis zeigten Versuche mit Bio-Gel P-6.

Auffallend war das Fehlen des Vorpeaks bei der Rechromatographie. Er war aber vorhanden, wenn das mit Serum 1:10 verdünnte markierte ACTH ohne zusätzliches Serum aufgetragen wurde (siehe Abb.17).

4.3.1.3. Ergebnisse mit der Gelfiltration.

4.3.1.3.1. Wiederfindung von exogenem ACTH im Serum nach Gelfiltration.

Verwendet wurde eine 5 ml Säule mit Sephadex G-50 fine. In einem Vorversuch mit markiertem Standard war der ACTH-Peak in den Fraktionen 6-25 gefunden worden.

Zu 500 µl Serum wurden 200 KIE Trasylol und 5 ng h-ACTH₁₋₃₉ gegeben. Es wurde kurz gemischt, 10 min. inkubiert und anschliessend mit der Sephadex Säule aufgetrennt. Je 10 µl der Fraktionen 6 mit 15, 16 mit 25 und 11 mit 20 wurden zusammengefasst, auf 0,5% BSA-pH 3,5 gebracht und im IAC-Assay bestimmt.

Der Elutionspuffer (0,9% NaCl-0,1 N HCl-0,2% Mercaptoäthanol), ebenfalls auf 0,5% BSA-pH 3,5 eingestellt, zeigte keinen störenden Einfluss auf die Standards im Assay.

In den Äquivalenten der Fraktionen 6 mit 15 befanden sich 64 pg ACTH, 16 mit 25 40,5 pg und 11 mit 20 82,5 pg. Auf das Gesamtvolumen des Peaks umgerechnet (ACTH-Menge der Fraktionen 6 mit 15 + 16 mit 25 mal 38) ergaben sich somit 3,97 ng, das sind 79,4% der eingesetzten ACTH-Menge.

4.3.1.3.2. Gelfiltration eines Serums mit hoher endogener ACTH-Aktivität.

Es wurden 180 µl Serum L. über eine 5 ml Sephadex G-75 Säule aufgetrennt. Eluiert wurde mit 0,9% NaCl-0,1 N HCl-0,5% Mercaptoäthanol. Je 100 µl einer jeden Fraktion wurden im IAC-Assay

eingesetzt. Es ergab sich ein einheitlicher ACTH-Peak (Fraktion 10 mit 19), der nicht ganz vom Protein abgetrennt war. Auf das Gesamtvolumen bezogen, enthielt er 1529 pg ACTH.

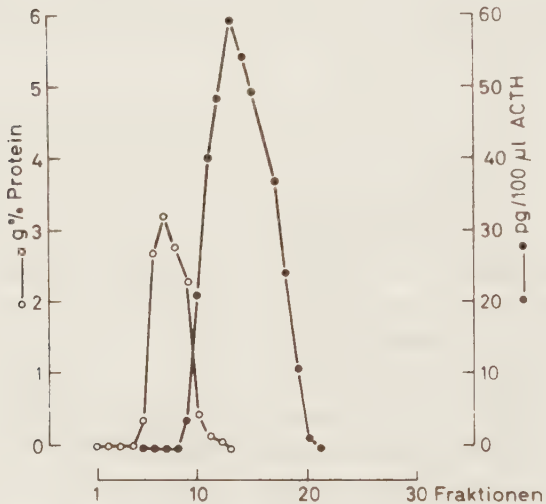


Abb.18: Gelfiltration von 180 µl Serum L. (Nelson-Syndrom)
auf Sephadex G-75.
Säule: 5 ml; Elutionsmittel: 0,9% NaCl-0,1 N HCl-0,5%
Mercaptoäthanol; Fraktion: Je 0,38 ml.
Die ACTH-Bestimmung der einzelnen Fraktionen wurde im
IAC-Assay durchgeführt.

Bei Einsatz von je 10 µl der Fraktionen 10 mit 19, die zu einer Probe zusammengefasst wurden, ergaben sich - bei entsprechender Umrechnung - 1558 pg. Demgegenüber standen 477 pg/50 µl, das sind 1715,5 pg/180 µl bei Einsatz des unbehandelten Serums im IAC-Assay.

Bei dieser Gegenüberstellung ist zu berücksichtigen, dass das verwendete Elutionsmittel (0,9% NaCl-0,1 N HCl-0,5% Mercapto-äthanol) die Corticosteronproduktion hemmt (siehe auch 3.3.4.). Es ergab sich eine Hemmung von $1 + 9\%$ bei 10 pg Standard ($N = 2$) und von $28 + 8\%$ bei 50 pg ($N = 3$). Folglich sind die an der Eichkurve (0,5% BSA-pH 3,5) abgelesenen ACTH-Werte der einzelnen Fraktionen um 20 bis 30% zu niedrig und müssten umgerechnet werden.

4.3.1.4. Diskussion zur Gelfiltration.

Die Wiederfindenquote von ca. 80% des einem Serum zugesetzten exogenen ACTH nach der Gelfiltration stellt einen hohen Anteil dar, verglichen mit $36 \pm 6,2\%$ ($N = 7$) bei unbehandelten Seren (gelagert bei -15°C , siehe Kap.4.1.3.2.); gegenüber den Proben, die sofort bei -80°C eingefroren wurden, ergab sich ein etwa gleicher Anteil.

Die ACTH-Aktivität des Serums L. war nach Gelfiltration etwas grösser als die des unbehandelten Serums, wenn man die Hemmwirkung des Elutionsmittels berücksichtigt.

Es ist folglich anzunehmen, dass durch die Gelfiltration eine ACTH-Inaktivierung durch Serumbestandteile zum Teil verhindert wird. Bei einer besseren Abtrennung der Serumproteine wären die ACTH-Werte noch höher gewesen; denn wie Untersuchungen mit den säulenchromatographisch vom ACTH abgetrennten Serumfraktionen ergaben, bewirken alle diese proteinhaltigen Fraktionen eine Hemmung der ACTH-Aktivität. Sie war in den jeweiligen Fraktionen etwa proportional zu der darin enthaltenen Proteinkonzentration. Ausserdem sei auf die Hemmwirkung der elektrophoretisch aufgetrennten Serumfraktionen verwiesen (siehe 4.1.4.2.), wobei sich zumindest für Albumin, α_1 und γ eine deutliche - wenn auch vielleicht unspezifische - Hemmung ergeben hatte. Es ist deshalb eine vollständige Abtrennung der Serumproteine erforderlich. Dies ist mit höheren Säulen möglich. Der Nachteil ist aber eine noch stärkere Verbreiterung des ACTH-Peaks, so dass die Hormonkonzentration im Eluat vieler Seren für den IAC-Assay zu niedrig würde.

Möglicherweise könnte in einem sehr empfindlichen Radioimmunoassay diese Trennmethode verwendet werden. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass nach Gelfiltration zwar die ACTH-Werte gegenüber den unbehandelten Seren ansteigen, die Wiederfindung von exogenem ACTH aber nicht ganz vollständig ist und bei endogenem ACTH der Abstand zu den ACTH-Werten des LN-Assays nur unwesentlich kleiner wird.

FEHM et al. (14, 15) fanden nach Chromatographie von Plasma auf Sephadex G-200 (Säule 1,5 x 30 cm) in den Eiweissfraktionen mit einem Molekulargewicht von 150 000 bis 200 000 die grösste "binding activity", d.h. nur noch ein kleiner Anteil des den einzelnen Fraktionen zugefügten ^{125}J -ACTH konnte als freies Hormon mit Quso G 32 bzw. Talcum wieder extrahiert werden. In diesem grossmolekularen Bereich erhielten sie bei Chromatographie von ^{125}J -ACTH nach einstündiger Inkubation in Plasma einen hohen Aktivitätsgipfel, wenn sie mit 0,02 M Veronal-Puffer (pH 8,6) eluierten. Bei saurer Elution (0,1 N Essigsäure) auf Sephadex G-50 sowie bei Elution mit 0,02 M Veronal-Puffer + 20 mM Ca^{++} auf Sephadex G-200 verschwand der ACTH-Peak im grossmolekularen Bereich fast vollständig; es ergab sich ein nahezu einheitlicher Peak, dessen Lokalisation dem ACTH-Molekulargewicht entsprach.

Bei dem von uns beobachteten Vorpeak handelt es sich möglicherweise um dieselbe Ursache: ACTH-Fixation an den "binding factor". Untermauert wird diese These durch das Fehlen des Vorpeaks bei Rechromatographie ohne Serum. Dass unser grossmolekularer Anteil kleiner war, dürfte an der geringeren Serummenge und der kürzeren Inkubationszeit liegen. Wir konnten einen kleinen Vorpeak auch bei saurer Elution nachweisen.

YALOW et al. haben in Plasmen, Hypophysen- und Tumorgeweben ein sogenanntes "big ACTH" gefunden (22, 23, 98, 99). Sowohl die absolute Menge als auch der Anteil am Gesamt-ACTH waren bei den einzelnen Patienten sehr unterschiedlich. Big-ACTH wanderte auf Sephadex G-100 (Säule 1 x 50 cm) vor $\text{hGH-}^{131}\text{J}$ und kurz nach

Albumin-¹³¹I. Eluiert wurde mit Plasma, das 1:10 mit 0,1 M NaCl bzw. 0,02 M Veronal-Puffer (pH 8,4) verdünnt war. Big-ACTH war zwar radioimmunologisch, nicht aber biologisch aktiv. Erst nach Vorbehandlung mit Trypsin waren die Werte im IAC-Assay genauso hoch wie im RIA.

v.WERDER fand bei radiochromatographischen Untersuchungen mit ³H-ACTH im Serum eine "eindeutige Kompetition von Serumproteinen (Albumin) und Dextrangel (Sephadex G-25) bezüglich der ACTH-Bindung" (90, 91, 92). Der grössere Teil des ³H-ACTH₁₋₂₃ wurde zusammen mit den Serumproteinen eluiert; der dextrangebundene Teil konnte nur mit 0,1 N HCl eluiert werden (Elutionsmittel: 0,01 M Na-Phosphatpuffer pH 7,4, anschliessend 0,1 N HCl). Proteingebundenes ³H-ACTH₁₋₂₃ zeigte im Gegensatz zu proteingebundenem Schweine-ACTH nur eine schwache biologische Aktivität im Lipscomb-Nelson-Assay.

Auch in unseren Versuchen war mit zwei Puffern (Elutionsmittel 1 und 2) keine vollständige Elution möglich. Bei verdünntem ACTH-freien Serum ergab sich beim Nachwaschen mit 0,9% NaCl-0,1 N HCl-0,5% Mercaptoäthanol allerdings nur noch ein kleiner Aktivitätsgipfel. Diese Befunde lassen sich gut mit der von v.WERDER beschriebenen Geladsorption erklären. Bei unseren Untersuchungen war jedoch ein viel geringerer Anteil des ACTH am Gel adsorbiert.

4.3.2. Quso-Extraktion.

4.3.2.1. Methode.

Quso besteht aus mikrofeinen präzipitierten Silikat-Granula, die aus SiO₂-Gruppen aufgebaut sind und deren riesige Oberfläche vollständig mit Silanol-(SiOH)Gruppen bedeckt ist. Die Granula sind nur wenig porös, besitzen aber eine sehr grosse Adsorptionskapazität.

Wir gingen im wesentlichen nach der von GIORDANO und SAYERS 1971 (24) beschriebenen Methode vor:

50 mg Quso G 32 werden mit 1 ml Serum bzw. Plasma 5 min. lang geschüttelt. Dann wird etwa ebenso lang bei 3000 U/min. zentrifugiert. Das extrahierte Serum, das den Überstand bildet, wird verworfen und das ACTH mit 1 ml 0,9% NaCl-0,1 N HCl aus den Silicat-Granula eluiert. Z.T. war der Niederschlag nur schwer wiederlöslich, sodass statt 5 min. bis zu 15 min. auf dem Whirlmix geschüttelt werden musste. Anschliessend wurde erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde im IAC-Assay eingesetzt. Die dabei erhaltenen ACTH-Werte verglichen wir mit den Werten, die bei Einsatz der unbehandelten Seren erzielt wurden. Die Proben wurden jeweils an der Normal-Eichkurve abgelesen. Zur Kontrolle wurde in einigen Bestimmungen die Elution des Qusos bis zu zweimal wiederholt.

4.3.2.2. Ergebnisse und Diskussion.

In Tab. 15 sind die ACTH-Werte verschiedener Seren und ihrer Quso-Eluate einander gegenübergestellt.

Bei zwei Normal-Patienten (Sch. und M.) sowie bei einer Hx-Ratte ergab sich weder mit Serum noch mit Quso-Eluat eine ACTH-Aktivität. Bei allen anderen Proben waren die Quso-Werte der jeweils ersten Elution höher als die Serumwerte; sie waren bei exogenem ACTH konstant zwei bis dreimal höher, während sie bei endogenem ACTH ganz unterschiedliche Abweichungen zeigten.

In einigen Bestimmungen wurde die ACTH-Elution aus dem Quso auf Vollständigkeit untersucht. In der beschriebenen Weise wurde ein zweites- bzw. drittesmal mit 1 ml 0,9% NaCl-0,1 N HCl eluiert. Bei allen untersuchten Proben war auch im zweiten und dritten Eluat ACTH nachzuweisen, wenn auch in abnehmender Menge.

Im Quso-extrahierten Serum wurde bei 6 Bestimmungen nur einmal - bei einer sehr hohen eingesetzten ACTH-Menge - noch ACTH gefunden (etwa 2% der eingesetzten Menge).

Tab. 15: Vergleich der ACTH-Werte im Quso-Extrakt und im Serum.

Alle Werte wurden an Eichkurven mit 0,5% BSA-pH 3,5 abgelesen. Bei den Proben mit exogenem ACTH₁₋₂₃ wurden jeweils Serum und Standard vor der Extraktion gemischt und 10 min. bei Zimmertemperatur inkubiert. Versuche bei einer Aufbewahrungstemperatur der Proben von -80° C.

Patient bzw. Tier	Vol. ein- ges. µl	pg ACTH bei Einsatz von				
		Serum	Quso-Extrakt		Quso-extr. Serum	
			1.Elut.	2.Elut.	3.Elut.	
Ratte NS	100	35,7	42,5			
Ratte St	100	32,5	66,5			
Ratte Hx	100	0	0			
Pat.Sch.	100	0	0			
Pat.M.	100	0	0			
Pat.M.K.	100	0,7	4,6			
Pat.L(2.)	100	588	820			
Pat.L(1.)	50	352	358,5	168	39,8	0
Pat.L(2.)	50	273	310			
Pat.M.+ 1000 pg ACTH	100	385	885	309		11,5
Pat.M.+ 500 pg ACTH	100	115	475			0
Pat.M.+ 500 pg ACTH	100	190	300	128,5		0
Pat.Sch.+500 pg ACTH	100	143	389	163		0
Pat.Sch.+100 pg ACTH	100	26	84,5	28		0

Zunehmende Volumina an Quso-Eluat, die im IAC-Assay eingesetzt wurden, ergaben einen nicht ganz parallelen Verlauf zur Eichkurve. Die Abweichungen waren allerdings nicht einheitlich in Grösse und Richtung (Tab.16). Weitere Untersuchungen sollten zeigen, ob das Quso-Eluat frei ist von den ACTH-Hemm Faktoren des Serums. Wir überprüften hierzu in Quso-Eluaten von Seren einer gestressten und einer hypophysektomierten Ratte die Wiederfindung von 50 pg ACTH. In beiden Fällen ergab sich eine deutliche volumen-abhängige Hemmwirkung (Versuche bei einer Aufbewahrungstemperatur der Pro-

ben von -15°C). Die Hemmfaktoren waren also z.T. noch vorhanden.

Tab. 16: Überprüfung der Parallelität von Quso-Extrakt und Eichkurve im IAC-Assay. Die Quso-Extrakte wurden in Volumina zwischen 5 und 100 μl eingesetzt.

Serum	pg ACTH bei Einsatz von			
	100 μl	50 μl	10 μl	5 μl
Ratte St.	66,5	27,0	10,5	
Ratte SN.	21,8	8,2	4,0	
Ratte NS.	42,5	15,0	5,4	
L.	466,0	270,0	33,5	17,2

Unter Berücksichtigung des pH-Wertes (= 1) sind im Elutionsmittel gegenüber der Normal-Eichkurve (pH 3,5) und auch gegenüber den Serumbestimmungen (mit physiolog. pH) höhere ACTH-Aktivitäten zu erwarten, denn das Elutionsmittel liegt näher am pH-Optimum (siehe Kap. 4.1.4.).

Nochmalige Untersuchungen bestätigten dies:

Die Wiederfindung im Elutionsmittel betrug bei 10 pg ACTH $179,9 \pm 9,5\%$ und bei 50 pg $164 \pm 15\%$ (die Werte der Eichkurve wurden gleich 100% gesetzt). Folglich sind die in Tab.12 angegebenen ACTH-Werte der Quso-Extrakte etwa um diesen Faktor zu hoch; d.h.

1. die Quso-Werte sind aber auch unter Berücksichtigung dieser Aktivitätsunterschiede fast immer deutlich höher als die Serum-Werte,
2. die Wiederfindung von in Serum inkubiertem ACTH ist auch bei der Quso-Extraktion nicht vollständig, wenn auch höher als bei der direkten Serumbestimmung.

In Quso-Extrakten ergibt sich somit in zweifacher Hinsicht eine Abweichung von der Standard-Eichkurve:

1. Eine Hemmung durch die verbliebenen Hemmfaktoren und

2. eine Aktivitätssteigerung durch den niedrigeren pH-Wert.

Welcher Einfluss überwiegt, ist wahrscheinlich vom verwendeten Serum (siehe Kap. 4.1.3.1. sowie FEHM (15)), der verwendeten ACTH-Menge und vor allem der Aufbewahrungszeit der Proben (siehe Kap. 4.1.3.2.) abhängig. Dies wäre eine Erklärungsmöglichkeit für die differierenden Wiederfindequoten zwischen Quso-Extrakten, die von Seren mit exogenem ACTH stammen (menschliche Seren mit 100 bis 1000 pg, aufbewahrt bei -80°C , siehe Tab.15) und solchen, zu denen erst nach der Elution ACTH zugefügt wurde (Rattenserum-Eluate mit 50 pg, aufbewahrt bei -15°C , siehe Tab. 17).

Tab. 17: Wiederfindung im Quso-Extrakt.

Zu verschiedenen Volumina Quso-Extrakt wurden jeweils 50 pg ACTH_{1-23} zugefügt und im IAC-Assay die Wiederfindung untersucht. Versuche bei einer Aufbewahrungstemperatur der Proben von -15°C ; in Klammern sind die im IAC-Assay gemessenen ACTH-Aktivitäten der Quso-Extrakte ohne ACTH-Zusatz wiedergegeben.

Serum	Vol.Quso-Extrakt in μl	ACTH wiedergefunden in pg
Ratte Hx	100	26,2
(0pg/100 μl)	50	27
	10	44
Ratte NS	100	24
(35,7 pg/ 100 μl)	50	39
	10	41

Zusammenfassend kann gesagt werden:

Durch Quso-Extraktion des Serums sind zwar höhere ACTH-Werte zu erzielen, die nicht allein durch den pH-Einfluss erklärt werden können, doch ist die ACTH-Elution vom Quso und die Abtrennung der Hemmfaktoren unvollständig. Auch SAYERS berichtet in einer neueren Arbeit (69) davon, dass sich im Quso-Eluat noch "inhibitory factor" befindet, sodass die ACTH-Werte

erniedrigt werden. Durch zweimaliges Nachwaschen des Quso vor der Elution (mit 0,9% NaCl-0,1% Albumin) konnte er ihn grösstenteils entfernen. Auf diese Weise fand er mehr als 90% des dem Serum zugefügten ACTH im Quso-Eluat wieder, allerdings erst nach zweimaligem Eluieren. SAYERS titriert jetzt das Eluat auf denselben pH-Wert wie die ACTH-Standards (= 3,5). Dies trägt sicher zur Richtigkeit der gemessenen Werte bei und sollte auch bei uns in den weiteren Versuchen so gemacht werden.

FEHM et al. fanden den "inhibitory factor" nur im Überstand (= Extrahiertes Serum, 14, 15). Sie wuschen vor dem Eluieren mit Phosphat-Puffer. Wie Untersuchungen mit einem Tracer zeigten, war der Verlust bei der Quso-Extraktion (in %) im selben Plasma für alle zugefügten ACTH-Mengen gleich gross; dagegen schwankte der Quso-extrahierbare Anteil von Plasma zu Plasma recht erheblich (wegen der unterschiedlichen "binding activity"). Ob FEHM et al. bei diesen Untersuchungen die pH-Differenzen zwischen Quso-Eluat und ACTH-Standard berücksichtigt haben, konnte nicht festgestellt werden.

4.4. Biologische ACTH-Aktivitäten in lipolytisch aktiven Hypophysenfraktionen (Lipotropine).

ANSELMINO und HOFFMANN (1) und MAGISTRIS (42) postulierten schon 1931 bzw. 1932 neben einer wachstumsfördernden und einer gonadotropen Wirkung der Hypophyse einen Einfluss auf den Fettstoffwechsel. Seither ist es zahlreichen Gruppen gelungen, lipotrope Substanzen ("Lipotropine", Übersicht bei 74) aus Hypophysen zu isolieren.

Da u.a. auch ACTH eine starke lipolytische Aktivität zeigt (38, 39) und ACTH und Lipotropine z.T. nur schwer voneinander zu trennen sind, ist es erforderlich, bei allen lipolytisch wirksamen Hypophysen-Extrakten die eventuelle ACTH-Kontamination und den daraus resultierenden Anteil der Lipolyse zu ermitteln.

In Zusammenarbeit mit P. SCHWANDT und Mitarbeitern untersuchten wir in den einzelnen Fraktionen von mehreren Hypophysenpräparationen die ACTH-Aktivität und verglichen sie mit den entsprechenden Lipolysewerten. Dabei sollten insbesondere Peptid B und Vorstufen überprüft werden, nachdem bereits frühere Untersuchungen für Peptid A und Vorstufen eine bedeutungslose ACTH-Kontamination in den damals untersuchten Chargen ergeben hatten (49).

4.4.1. Extraktion und Reinigung der lipolytisch aktiven Hypophysenfraktionen (66, 72). +)

Aus lyophilisierten Schweinehypophysen wurde durch eine Kombination von NaCl-Fällung (pH=8,5) und schrittweiser Aceton-Extraktion (pH=4,5) das Rohextrakt G gewonnen. In Abb.19 ist die weitere Auftrennung dieses Rohextraktes in seine Unterfraktionen wiedergegeben.

Mittels der Acrylamidgel-Elektrophorese wurden aus Fraktion J_{lnach} die Fraktionen F und D und schliesslich durch Säulenchromatographie (auf DEAE-Sephadex A-25) aus Fraktion F das Peptid B dargestellt. Peptid A wurde durch säulenchromatographische Reinigung (auf Sephadex G-50) der Fraktion J gewonnen.

4.4.2. Bestimmung der lipolytischen Aktivität. +)

Die Bestimmung der lipolytischen Aktivität in den einzelnen Fraktionen erfolgte für Charge 9 im in-vitro-Test am intakten Fettgewebe des Kaninchens (73), für Charge P und die Fraktion A_{28/29} in vivo am Kaninchen (72).

+) Durchgeführt von PD. Dr. P. Schwandt und Mitarbeitern,
I. Med. Univ. Klinik München.

Die in-vivo-Lipolyse von 2,5 µg Acethropan^R-S ergab mit $0,05 \pm 0,15 \text{ mMol/l}$ FFS (N=5) praktisch einen Nullwert (49).

Synacthen^R zeigte in vitro $2,25 \pm 0,38 \text{ µMol FFS/100 mg} \times 3 \text{ h}$ bei einer Konzentration von 100 ng/3 ml; die Werte für 10 bzw. 1 ng/3 ml betrugen $0,24 \pm 0,11$ und $0,11 \pm 0,12 \text{ µMol/100 mg} \times 3 \text{ h}$ (jeweils N = 6).

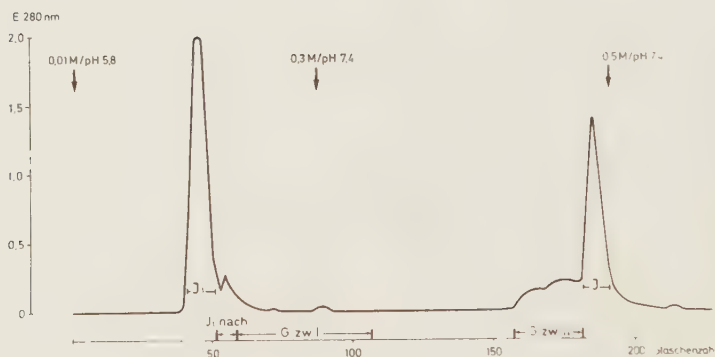


Abb. 19: Chromatographie von 1 g Fraktion G₉ auf CM-Sephadex C-25.

Elutionsmittel: Phosphatpuffer - 0,01 M (pH 5,8) bis Glas 85
 - 0,3 M (pH 7,4) bis Glas 190
 - 0,5 M (pH 7,4) bis Glas 230

Flussgeschwindigkeit: 110 ml/h; Säule: 2,5 x 50 cm
 Fraktion: 5 ml/Glas

Nicht eingezeichnet ist Fraktion J_{nach}, die sich an J anschliesst; sie wurde in Charge^{nach} nicht bestimmt.

4.4.3. ACTH-Aktivitäten in den einzelnen Fraktionen.

Die Chargen 2 und P wurden im LN-Assay, die Charge 9 im IAC-Assay bestimmt. Die lyophilisierten Fraktionen wurden wie die ACTH-Standards behandelt, d.h. im selben Lösungsmittel verdünnt, in gleicher Weise aufbewahrt und in den Assays eingesetzt (Tab.18).

Es fallen die sehr unterschiedlichen ACTH-Konzentrationen der 3 Präparationen auf, Charge P enthält etwa 75mal weniger ACTH als Charge 2 und 150mal weniger als Charge 9. Dagegen verhalten sich die ACTH-Anteile innerhalb einer gleichen Charge von Fraktion zu Fraktion im Verhältnis zueinander etwa gleich, mit Ausnahme der Fraktionen, die nur eine ganz geringe ACTH-Aktivität enthalten.

Nach Auftrennung des Rohextraktes G enthalten die Fraktionen J und J_{nach} praktisch das gesamte biologisch aktive ACTH, die anderen Fraktionen dagegen nur minimale Mengen. In Fraktion A wird etwa die gleiche ACTH-Konzentration wiedergefunden wie in J, d.h. die weiteren Reinigungsschritte haben keine bessere Abtrennung vom ACTH bewirkt.

Auf Grund der so stark differierenden ACTH-Werte zwischen den einzelnen Chargen sollte die Schwankungsbreite der ACTH-Verreinigung noch für weitere Chargen ermittelt werden. Wir untersuchten deshalb Peptid A in den Chargen 22 und 28 - 33. Wie Tab. 19 zeigt, ergaben sich auch in diesen Fraktionen sehr unterschiedliche ACTH-Konzentrationen.

4.4.4. Wiederfindequoten von exogenem ACTH in den Hypophysenfraktionen.

Zur Richtigkeit der Messwerte im IAC-Assay wurden Wiederfinderversuche durchgeführt. In Fraktion G wurden $105 \pm 8\%$ (N = 5), in Fraktion B $96 \pm 6\%$ (N = 2) des zugefügten ACTH (verschiedene Konzentrationen zwischen 5 und 80 pg) wiedergefunden. Das bedeutet, dass in diesen Hypophysenfraktionen - im Gegensatz zur ACTH-Bestimmung im Serum - keine hemmenden Substanzen enthalten sind (siehe Kap. 4.1.).

Fraktion	CHARGE 2				CHARGE 9			
	A C T H			N	A C T H			N
	eingesetzte Menge µg	ng / µg LN-Assay			eingesetzte Menge µg	ng / µg IAC-Assay		
		$\bar{x}$	$\pm s$			$\bar{x}$	$\pm s$	
G	0,5	21,220	$\pm$ 12,581	4	0,01 0,02	10,4931 12,0133	$\pm$ 1,8533 $\pm$ 1,1075	4 2
J ₁	60 10	0,015 0,0123	$\pm$ 0,009	3 1	50	0,0017	$\pm$ 0,0004	4
J _{lnach}	100 20	0,1098 0,1489	$\pm$ 0,0234 $\pm$ 0,058	3 2	2	0,0035	$\pm$ 0,0001	2
G _{zw.I}	100 50	0,1351 0,1432	$\pm$ 0,0516	3 1	5	0,0142	$\pm$ 0,0022	2
G _{zw.II}	50	0,1632	$\pm$ 0,0797	4	1	0,0283	$\pm$ 0,0004	2
J	1 0,1	15,063 10,222	$\pm$ 6,701 $\pm$ 4,611	3 2	0,005 0,002	11,175 12,012	$\pm$ 1,513 $\pm$ 0,932	4 2
J _{nach}					0,005	6,201	$\pm$ 0,2828	2
A	0,5	23,4366	$\pm$ 9,2892	6	0,005 0,002	7,322 6,993	$\pm$ 0,514	3 1
A _{peak}								
A _{nach}					0,05	3,1421	$\pm$ 0,5314	4
B	100	0,0133	$\pm$ 0,0048	3	50	0,00018	$\pm$ 0,00001	4
D	100	0,0195	$\pm$ 0,0038	3				

Tab. 18: ACTH-Aktivität und lipolytische Aktivität der lipoid-mobilisierenden Hypophysenfraktionen.

Eingesetzte Substanzmenge bei in-vivo-Lipolysebestimmung:
Je 250 μg , bei in-vitro-Lipolysebestimmung wurden jeweils
3 ml der folgenden Konzentrationen eingesetzt:

Peptid A und B 0,1 nMol/ml; alle andere Fraktionen
0,6 $\mu\text{g/ml}$

Die ACTH-Bestimmung in Charge P wurde von W. PISTER (60)
durchgeführt.

CHARGE 9				CHARGE P			
LIPOLYSE		ACTH		LIPOLYSE			
Δ FFS $\mu\text{Mol}/100\text{mg} \times 3\text{h}$ in vitro $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	N	einge- setzte Menge μg	ng / μg LN-Assay $\bar{x} \pm s$	N	Δ FFS mMol/l in vivo $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	N	
1,19 $\pm$ 0,50	6	100 10	0,1398 $\pm$ 0,0051 0,134 $\pm$ 0,008	3 5	1,51 $\pm$ 0,24	6	
1,60 $\pm$ 0,44	6				1,11 $\pm$ 0,23	6	
2,07 $\pm$ 0,47	6						
0,65 $\pm$ 0,17	6				0,02 $\pm$ 0,03	6	
1,00 $\pm$ 0,30	6				0,12 $\pm$ 0,09	6	
2,53 $\pm$ 0,54	6	100 10	0,2721 $\pm$ 0,0731 0,185 $\pm$ 0,013	6 2	2,99 $\pm$ 0,20	6	
2,38 $\pm$ 0,36	6	100 10	0,1645 $\pm$ 0,0131 0,171 $\pm$ 0,015	3 3	3,28 $\pm$ 0,09	6	
		100 10	0,1235 $\pm$ 0,0279 0,110 $\pm$ 0,013	3 3			
2,24 $\pm$ 0,49	6						

Tab. 19: ACTH-Aktivität und lipolytische Aktivität von Peptid A aus verschiedenen Chargen.
Einzelzeiten im Text bzw. in Tab. 18. Der mit + bezeichnete Lipolysewert resultiert aus einer Kombination von A₂₈ und A₂₉.

Peptid	einge- setzte Menge µg	A C T H ng / µg		N	LIPOLYSE	
		IAC- Assay $\bar{x} \pm s$	LN- Assay $\bar{x} \pm s$		Δ FFS in vivo bzw. in vitro $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	N
A _P	100 10		0,1645 + 0,0131 0,1710 ± 0,015	3 3	3,28 + 0,09 (mMol/1)	6
A ₂	0,5		23,4366 ± 9,2892	6		
A ₉	0,005 0,002	7,322+0,514 6,993		3 1	2,38 + 0,36 (µMol/100mgx3h)	6
A ₂₂	0,5 1		9,3221 + 2,8849 9,361	5 1		
A ₂₈	0,01	1,051		1		
A ₂₉	0,02	0,8652±0,0353		2	1,75 + 0,27 ⁺ (µMol/100mgx3h)	6
A ₃₀	0,02	0,8675±0,0035		2		
A ₃₁	0,02	0,6150±0,0636		2		
A ₃₂	0,01	0,5325±0,0177		2		
A ₃₃	0,01	1,08		1		

4.4.5. Diskussion zu den ACTH-Werten der Hypophysenfraktionen

Es fällt auf, dass alle Fraktionen mit relativ hoher ACTH-Aktivität auch hohe Lipolysewerte ergeben: dieser Satz ist aber nicht umkehrbar:

J₁ und das daraus gewonnene Peptid B bewirken einen starken Anstieg der FFS in vivo, während sie selbst in hohen Dosen die Nebennierenzellen kaum stimulieren (siehe Tab. 18). Es be-

steht also keine Parallelität zwischen ACTH-Aktivität und den Lipolysewerten.

Für Peptid A und Vorstufen wurde auf Grund früherer Ergebnisse (49, 60) der Schluss gezogen, dass

1. ACTH nur einen Anteil von weniger als 1% zur lipolytischen Aktivität dieser Fraktionen beiträgt und
2. diesen relativ geringen ACTH-Aktivitäten in den einzelnen Fraktionen wahrscheinlich eine ACTH-Kontamination zu Grunde liegt und nicht eine intrinsic activity der Lipotropine, z.B. durch eine ACTH-ähnliche Wirkung von Bruchstücken.

Diese Ergebnisse berücksichtigen u.a. die in-vivo-Lipolyse von Acethropan^R-S und von Schweine-ACTH (49).

Bei unseren jetzigen Messungen lagen die ACTH-Aktivitäten für Peptid A und seine Vorstufen z.T. erheblich (um Zehnerpotenzen) höher. Ausserdem ermittelten SCHWANDT und Mitarbeiter zwischenzeitlich für Synacthen^R in der in-vitro-Lipolyse (siehe 4.4.2.) eine Erhöhung der FFS von 0,29 $\mu\text{Mol}/100 \text{ mg} \times 3 \text{ h}$ für 100 ng/3 ml (vorläufige, unveröffentlichte Ergebnisse). Rein rechnerisch würde sich deshalb für Peptid A der Charge 9 unter Berücksichtigung des ACTH-Gehaltes von ca. 0,73% (auf Gewichtsmengen bezogen) ein Anteil von ca. 12,2% der lipolytischen Aktivität als ACTH-bedingt ergeben. Zur endgültigen Sicherung dieses gegenüber den früheren Untersuchungen deutlich "schlechteren" Ergebnisses sind allerdings weitere Versuche erforderlich:

1. Da das verwandte Synacthen-Präparat keine besonders gereinigte Charge war, muss die Messung der lipolytischen Aktivität in vivo und in vitro mit einem genau standardisierten Präparat wiederholt werden.
2. Vor allen Dingen muss die lipolytische Aktivität von Schweine-ACTH im in-vitro-Test untersucht werden;
3. auch müssten - zusätzlich zu den bereits gemessenen biologischen ACTH-Aktivitäten - die lipolytischen Aktivitäten dieser verschiedenen Chargen untersucht werden.

Bei Peptid B kann die durch die minimale ACTH-Verunreinigung bedingte Lipolyse - unabhängig von der verwendeten Methode zur Messung der lipolytischen Aktivität - auf jeden Fall vernachlässigt werden (50).

5. ZUSAMMENFASSUNG

5.1. Mit dem sehr arbeitsaufwendigen LN-Assay lassen sich zwar biologische ACTH-Aktivitäten direkt im Serum bestimmen, doch ergeben sich grosse Schwankungen bei den einzelnen Bestimmungen. Zudem lassen sich wegen der mangelnden Empfindlichkeit physiologische Hormonspiegel im Serum nicht befriedigend messen.

Demgegenüber zeichnet sich der IAC-Assay durch eine hohe Empfindlichkeit (untere Nachweisgrenze pro Ansatz: 1-2,5 pg) und ausgezeichnete Übereinstimmungen bei Mehrfachmessungen aus.

Nach unseren Vorversuchen ist seine Qualität u.a. abhängig von der Rührgeschwindigkeit bei der Zellpräparation (Optimum bei 500 U/min.), dem verwendeten Trypsinpräparat, der LBI-Menge bzw. vom Trasylol^R-Zusatz. Mercaptoäthanol war zum Schutz des ACTH ungeeignet, da es in höheren Konzentrationen offenbar die Nebennierenzellen schädigt.

5.2. Die Corticosteron-Produktion wurde im IAC-Assay bis zu einer Inkubationszeit von 180 min. verfolgt. Nach einer anfänglichen Verzögerungsperiode (5 - 20 min.) beginnt ein steiler Corticosteronanstieg, der nach 2 Stunden allmählich abflacht. Die Empfindlichkeit des Assays stieg mit zunehmender Inkubationszeit an.

Synthetisches h-ACTH₁₋₃₉, Schweine-ACTH₁₋₃₉ (aus Hypophysen isoliert) und synthetisches ACTH₁₋₂₃ zeigten nach 2-stündiger Inkubation weitgehend identische Dosis-Wirkungskurven bei Einsatz gleicher Gewichtsmengen. Bei 1/2-stündiger Inkubation ergab das ACTH₁₋₂₃ gegenüber dem h-ACTH₁₋₃₉ eine doppelt so grosse Aktivität, d.h. es ergab sich für diese Präparate eine unterschiedliche Kinetik.

5.3. In Normalseren (N = 15) konnte trotz genügender Empfindlichkeit des Assays keine ACTH-Aktivität gemessen werden. Entsprechend verliefen Wiederfindungskurven von exogenem ACTH in

90 µl Normalserum bei allen drei verwendeten ACTH-Präparaten (s.o.) - nach rechts verschoben - parallel zur Eichkurve, d.h. die Wiederfindung war unvollständig. Zwischen Seren mit verschiedener endogener ACTH-Konzentration schwankte die Wiederfinderate ausserordentlich stark, nämlich zwischen 3 und 102%. Sie war umso geringer, je grösser das Serumvolumen, je niedriger der endogene ACTH-Spiegel, je länger die Inkubationszeit bzw. Aufbewahrungszeit (im flüssigen Zustand) und je niedriger die Konzentration an zugesetzten Proteasen-Inhibitoren war. Durch Verkürzung der Aufbewahrungszeit der ACTH-Proben (im flüssigen Zustand) auf wenige Minuten, konnte die Wiederfinderate auch in Normal- bzw. Hx-Seren auf ca. 80% gesteigert werden. Trotzdem waren dadurch noch keine ACTH-Normalspiegel im Serum direkt messbar.

5.4. Die ACTH-Werte von 3 Seren mit hoher endogener Konzentration waren wesentlich höher, wenn sie im LN-Assay gemessen wurden, als bei der Messung im IAC-Assay. Z.T. ist diese Diskrepanz zwar durch nicht optimale Versuchsbedingungen im IAC-Assay verursacht, trotzdem verbleibt aber zumindest ein 2,5 - 10facher Aktivitätsunterschied. Auf der Suche nach dessen Ursache fanden wir, dass die ACTH-Bestimmung im IAC-Assay ausserordentlich abhängig von pH- und Protein-Veränderungen im Medium war. Das Wirkungsoptimum für Standards in 4% BSA lag bei pH 3,5; für Standards in 0,5% BSA bei pH 1,2 und für Seren wechselnd zwischen pH 3,8 und 1,6. Einzelne elektrophoretisch aufgetrennte Serumproteine (Albumin, α_1 , γ) ergaben bei pH=1 eine eindeutige Hemmwirkung auf die ACTH-Aktivität.

5.5. Zumindest z.T. liessen sich die in Seren, Serumfraktionen und Standardlösungsmitteln beobachteten Hemmwirkungen durch eine Proteinbindung des ACTH erklären. Dabei dürfte der freie (= aktive) ACTH-Anteil vom pH-Wert abhängig sein. Denn jede pH-Senkung, sei es direkt durch Titrieren des Standards bzw. Serums oder indirekt durch eine zunehmende Pufferkapazität des ACTH-Lösungsmittels (bei pH 3,5), ist bis zu einer bestimmten

Grenze mit einer Aktivitätssteigerung verbunden. Für einen pH-abhängigen freien ACTH-Anteil spricht auch, dass nur im Sauren ($\text{pH} = 1$) eine zufriedenstellende Elution aus Ouso, Sephadex- und Bio-Gel möglich ist, während im Neutralen je nach Extraktionsmittel eine mehr oder weniger starke Adsorption erfolgt.

Es wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen dem(n) wahrscheinlich unspezifischen Hemmfaktor(en) in unseren Versuchen und dem von anderen Autoren postulierten "inhibitory factor" bzw. "binding factor" diskutiert.

5.6. Die Gelfiltration mit Sephadex G-75, G-50 fine, Bio-Gel P-10 und P-6 erwies sich auf der Basis des Molekularsieb-Effektes grundsätzlich zur ACTH-Abtrennung von den Serumproteinen als geeignet; die Säulenhöhe muss aber mindestens 20 cm betragen. Nur mit 0,9% NaCl-0,1 N HCl-0,2% Mercaptoäthanol als Elutionsmittel war eine vollständige und relativ schmale Elution möglich.

Die Wiederfindung von exogenem ACTH im Serum betrug nach Gelfiltration 80%; bei hohem endogenem ACTH-Spiegel waren die Werte nach der Gelfiltration etwas höher als bei unbehandeltem Serum (Versuche bei nicht ganz vollständiger Trennung von ACTH und Proteinen), jedoch war die Steigerung noch viel zu gering, berücksichtigt man die im LN-Assay gemessenen Werte. Durch die Gelfiltration kommt es zu einem so starken Verdünnungseffekt, dass dieses Verfahren für die ACTH-Extraktion aus Normalseren beim IAC-Assay z.Zt. noch nicht brauchbar ist. Eine auch nur einigermaßen vollständige Extraktion des ACTH aus dem Serum auf der Basis der Gel-Adsorption mit anschließender Elution (z.B. mit 0,1 N HCl) war mit keinem der untersuchten Gele zu erreichen.

5.7. Extraktionen des Serums mit Ouso G 32 brachte gegenüber den direkten Serumbestimmungen höhere ACTH-Werte, doch war die Elution aus den Silicat-Granula und die Abtrennung der Serum-

Hemmfaktoren unvollständig. Auch schwankte die Wiederfinderate von Serum zu Serum.

5.8. Mit dem LN-Assay wurden 6 Patienten mit Nelson-Syndrom untersucht. Alle Seren wiesen stark bis exzessiv erhöhte ACTH-Spiegel auf. Diese zeigten weder einen Tagesrhythmus noch waren sie durch einen Stimulations- bzw. Suppressions-test wesentlich zu beeinflussen. Das spricht für eine Sekretionsstarre des ACTH beim Nelson-Syndrom. Die ACTH-Spiegel waren einige Wochen nach Hypophysektomie unverändert hoch. Auch ein Patient mit M.Addison und ein Patient mit ektopischem ACTH-Syndrom hatten stark erhöhte ACTH-Serumspiegel.

Die im IAC-Assay gemessenen ACTH-Serumspiegel bei verschiedenen Krankheitsbildern der Hypophyse bzw. der Nebennieren können aus den genannten Gründen nicht als die echten ACTH-Werte angesehen werden; jedoch lässt sich feststellen, dass sie gegenüber den Normalwerten zumindest mässig bis sehr stark erhöht sind.

5.9. Im IAC-Assay lag die Wiederfinderate von exogenem ACTH in Hypophysenextrakten bei 100%. Mit dem IAC-Assay ist also die Bestimmung der echten ACTH-Spiegel in Hypophysenextrakten - im Gegensatz zum Serum - möglich. Im Vergleich zu früheren Untersuchungen mit dem LN-Assay enthielten lipolytisch aktive Hypophysenfraktionen z.T. wesentlich höhere ACTH-Verunreinigungen, nämlich bis zu 2,3% (sowohl im LN-Assay als auch im IAC-Assay). Von den am meisten gereinigten und lipolytisch aktivsten Peptiden enthielt A etwa die gleiche ACTH-Konzentration wie das Rohextrakt G; Peptid B zeigte dagegen nur Spuren von ACTH-Aktivität. Stark differierende ACTH-Verunreinigungen ergaben sich für Peptid A verschiedener Chargen. ACTH-Standards bewirkten in entsprechenden Mengen zwar im in-vivo-Lipolyse-Test keinen signifikanten Anstieg der FFS, jedoch beim in-vitro-Test eine starke lipolytische Aktivität, d.h. die in den Fraktionen G, A und J gemessene Lipolyse könnte z.T. durch die ACTH-Kontamination bedingt sein (z.B. bei Peptid A₉ max. 12,2%). Zur Klärung dieser Diskrepanzen sind weitere Untersuchungen erforderlich.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. ANSELMINO, K.J., und E.HOFFMANN:
Das Fettstoffwechselhormon des
Hypophysenvorderlappens.
Klin.Wschr. 10, 2380 (1931).
2. BAETZNER, P., H.L.FEHM, K.H.VOIGT, M.SCHLEYER and
E.F.PFEIFFER:
Measurement of biological activity
in various growth hormone prepara-
tions using a modified tibia test.
Acta endocr. 70, 231 (1972).
3. BERSON, S.A., and R.S.YALOW:
Radioimmunoassay of ACTH in plasma.
J. clin. Invest. 47, 2725 (1968).
4. BERSON, S.A., and R.S.YALOW:
Introduction to the Symposium on
Radioimmunoassay. General Principle.
In: 7th International Congress of
Clinical Chemistry, Genf 1969.
Eds.: J.P.Felber and J.J.Scheidegger;
S.Karger, Basel 1970, Vol.3, p.89.
5. BESSER, G.M., D.N.ORTH, W.E.NICHOLSON, R.L.BYYNY,
K.ABE and J.P.WOODHAM:
Dissociation of the disappearance of
bioactive and radioimmunoreactive
ACTH from plasma in man.
J. clin. Endocr. 32, 595 (1971).
6. BESSER, G.M.:
ACTH and MSH assays and their clinical
application.
Clin. Endocr. 2, 175 (1973).
7. BIRMINGHAM, M.K. and A.BARTOVA:
Effects of calcium and theophylline
on ACTH- and dibutyryl cyclic AMP-
stimulated steroidogenesis and glyco-
lysis by intact mouse adrenal glands
in vitro.
Endocrinology 92, 743 (1973).
8. CAMPBELL, R.C.:
Statistische Methoden für Biologie
und Medizin.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1971).

9. CHAYEN, J., N.LOVERIDGE and J.R.DALY:
A sensitive bioassay for adreno-
corticotrophic hormone in human
plasma.
Clin.Endocr. 1, 219 (1972).
10. DALY, J.R., N.LOVERIDGE, L.BITENSKY and J.CHAYEN:
Early experience with a highly sen-
sitive bioassay for ACTH.
Ann. clin.Biochem. 9, 81 (1972).
11. DAVIS, B.M.A.:
Blood corticotrophin in normal
adults and in patients with cushing's
syndrome.
Acta endocr. (Kbh.) 45, 55 (1964).
12. DIEM, K. und C.LENTNER:
Wissenschaftliche Tabellen.
Documenta Geigy, 7. Auflage,
Basel (1968).
13. ESPINOZA, A., J.ANDRESEN and M.KROLL:
Biological ACTH determination in
human plasma in the pg-range.
Acta endocr. (Kbh.) Suppl.184, 163
(1974).
14. FEHM, H.L., K.H. VOIGT and E.F. PFEIFFER:
Problems and artefacts in ACTH-assay.
Horm. Metab. Res. 4, 477 (1972).
15. FEHM, H.L., K.H. VOIGT, R.LANG, M.B.ÖZYOL and
E.F. PFEIFFER:
Influence of plasma on ACTH stimulated
corticosterone production of isolated
adrenal cells.
FEBS Letters 36, 109 (1973).
16. FLEISCHER, N., J.R. GIVENS, K.ABE, W.E.NICHOLSON and
G.W.LIDDLE:
Studies of ACTH antibodies and their
reactions with inactive analogues of
ACTH.
Endocrinology 78, 1067 (1966).
17. FORSHAM, P.H., V.C.DIRAIMONDO, E.G.BIGLIERI and
C.H. LI:
Adrenocorticotrophic activity of a
synthetic nonadecapeptide (NDP) in man.
Metabolism 10, 335 (1961).
18. FREUD, J.:
Die Hypophysektomie.
In: Handbuch der biologischen Arbeits-
methoden, Eds.: E.Abderhalden, Abt.V,
Teil 3 B II, S.1442, Urban und Schwarzen-
berg, Berlin (1938).

19. GAY, V.L.:
A stereotaxic approach to transauricular hypophysectomy in the rat. *Endocrinology* 81, 1177 (1967).
20. GENAZZANI, A.R., F.FRAIOLI, J.P.FELBER, C.CONTI and P.FIORETTI:
ACTH radioimmunoassay: Methodological problems and clinical applications. Symposium on Radioimmunoassay and Related Procedures in Clinical Medicine and Research, Istanbul (1973).
21. GERB, A.C.:
Eine verbesserte fluorimetrische Methode zur Bestimmung von "Cortisolspiegeln" im Serum. Dissertation, Universität München (1969).
22. GEWIRTZ, G. and R.S.YALOW:
Ectopic ACTH production: Big and Little forms. *Endocrinology (Suppl.)* 92, A-53 (1973).
23. GEWIRTZ, G., B.SCHNEIDER, D.T.KRIEGER and R.S.YALOW:
Big ACTH: Conversion to biologically active ACTH by trypsin. *J. clin. Endocrinol. Metab.* 38, 227 (1974).
24. GIORDANO, N.D., and G.SAYERS:
Isolated adrenal cells: Assay of ACTH in Rat Serum. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 136, 623 (1971).
25. GIRARD, F. and V.K. VANCE:
Modification of Lipscomb-Nelson bioassay for ACTH. *Endocrinology* 71, 325 (1962).
26. GRAHAM-SMITH, D.B., R.W.BUTCHER, R.L.NEY and E.M.SUTHERLAND:
Adenosine 3',5'-monophosphate as the intracellular mediator of the action of adrenocorticotrophic hormone on the adrenal cortex. *J. Biol. Chem.* 242, 5535 (1967).
27. HACKER, R.:
Biologische Bestimmung der ACTH-Aktivität im menschlichen Plasma. Dissertation, Universität München (1966).

28. HOLDAWAY, I.M., L.H.REES and J.LONDON:
Circulating corticotrophin levels
in severe hypopituitarism and in the
neonate.
Lancet 24, 1170 (1973).
29. HUNTER, W.M. and F.C.GREENWOOD:
Preparation of iodine-131 labelled
human growth hormone of high specific
activity.
Nature (Lond.) 194, 495 (1962).
30. IMURA, H., L.L.SPARKS, G.M.GRODSKY and P.H.FORSHAM:
Immunologic studies of adrenocortico-
tropic hormone (ACTH): Dissociation
of biologic and immunologic activities.
J. clin. Endocr. 25, 1361 (1965).
31. ISLAND, D.P., N.SHIMIZU, W.E.NICHOLSON, K.ABE,
E.OGATA and G.W.LIDDLE:
A method for separating small quan-
tities of MSH and ACTH with good
recovery of each.
J. clin. Endocr. 25, 975 (1965).
32. KITABCHI, A.E., R.K.SHARMA and W.H.WEST:
A sensitive bioassay method for ACTH
using isolated adrenal cells.
Horm. Metab. Res. 3, 133 (1971).
33. KITABCHI, A.E. and R.K.SHARMA:
Corticosteroidogenesis in isolated
adrenal cells of rats. I. Effect of
corticotropins and 3',5'-cyclic
nucleotides on corticosterone
production.
Endocrinology 88, 1109 (1971).
34. KLUGE, F.J.:
Zur biologischen Bestimmung von ACTH-
Plasmaspiegeln: Verteilung von endo-
genem ACTH im Körper und Bindung an
Serumproteine.
Dissertation, Universität München
(1967).
35. LONDON, J.V., H.T.JAMES, R.J.CRYER, V.WYNN and
A.W. FRANKLAND:
Adrenocorticotrophic effects of a
synthetic polypeptide—8¹-24-Cortico-
tropin—in man.
J. clin. Endocr. 24, 1206 (1964).
36. LAURENT, T.C., and J.KILLANDER:
The theory of gel filtration and its
experimental verification.
J. Chromatog. 14, 317 (1964).

37. LEFKOWITZ, R.J. and J.ROTH:
Radioreceptor assay of adreno-
corticotropic hormone: New approach
to assay of polypeptide hormones in
plasma.
Science 170, 633 (1970).
38. LEOVITZ, H.E.:
ACTH-Physiology: Extra adrenal
actions.
In: Methods in Investigate and Diagnos-
tic Endocrinology. Vol. 2 A
Eds.: S.A.Berson and R.S.Yalow,
North-Holland Publishing Company -
Amsterdam-London; American Elsevier
Publishing Company, Inc.- New York
(1973), p. 349.
39. LEOVITZ, H.E., and F.L.ENGEL:
In vivo and in vitro adipokinetic
effects of corticotropin and related
peptides.
In: Handbook of Physiology, Sect. 5,
Eds.: A.E.Renold, G.F.Cashill jr.:
Williams & Wilkins, Baltimore
(Maryland), (1965), p. 541.
40. LIDDLE, G.W., D.ISLAND and C.K.MEADOR:
Normal and abnormal regulation of
corticotropin secretion in man.
In: Recent Progress in Hormone
Research, Vol. 18, Ed.: G.Pincus.
New York and London, Academic Press,
(1962), p. 125.
41. LIPSCOMB, N.S. and D.H.NELSON:
A sensitive biologic assay for ACTH.
Endocrinology 71, 13 (1962).
42. MAGISTRIS, H.:
Das Fettstoffwechselhormon des Hypo-
physenvorderlappens.
Endocrinology 11, 176 (1932).
43. MAHAFFEE, D., B.WATSON and R.L.NEY:
The relationship between nucleotide
structures and the stimulation of
adrenal steroidogenesis.
Clin.Res. 18, 73 (1970).
44. MARSCHNER, I., H.DOBRY, F.EHRHARDT, T.LANDERSDORFER,
B.POPP, C.RINGEL und P.C. SCRIBA:
Berechnung radioimmunologischer Mess-
werte mittels Spline-Funktionen.
Das Ärztl.Labor 20, 184 (1974).

45. MATSUYAMA, H., A.RUHMANN-WENNHOLD and D.H.NELSON:
Biologic and immunologic similarities between rat and human adrenocorticotropin.
Endocrinology 87, 756 (1970).
46. MATSUYAMA, H., R.B.MIMS, A.RUHMANN-WENNHOLD and D.H.NELSON:
Bioassay and radioimmunoassay of plasma ACTH in adrenalectomized rats.
Endocrinology 88, 696 (1971).
47. MEAKIN, J.W., W.H.TINGEY jr. and D.H.NELSON:
The catabolism of adrenocorticotrophic hormone: The stability of adrenocorticotrophic hormone in blood, plasma, serum and saline.
Endocrinology 66, 59 (1960).
48. MÜLLER, O.A.:
Zum Wirkungsmechanismus des Adrenocorticotropen Hormons: Die subzelluläre Verteilung des H-ACTH in der Rattennebenniere.
Dissertation, Universität München (1968).
49. MÜLLER, O.A., W.PISTER, P.SCHWANDT, P.C.SCRIBA and P.WEISWEILER:
Biological ACTH activity of lipid mobilizing peptid fractions from hog pituitaries.
Horm.Metab.Res. 5, 258 (1973).
50. MÜLLER, O.A., X.BAUR, I.MARSCHNER, P.SCHWANDT, P.C.SCRIBA and P.WEISWEILER:
ACTH bioassay with isolated rat adrenal cells: ACTH activity of the porcine lipotropic peptide B.
Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 184, 164 (1974).
51. MUNSON, P.L.:
Adrenocorticotrophic hormone.
In: Hormones in Human Plasma.
Ed.: H.N.Antoniades,
Liddle, Brown and Company, Boston (1960).
52. NAHRS, P.W., M.STAHL, M.DAMBACHER, J.RAUMANN and J.GIRARD:
On the use of a peptidase inhibitor (Trasylol) for storage of J¹²⁵-labelled peptide hormones.
Experientia 28, 213 (1972).

53. NELSON, D.H., H.MATSUYAMA and A.RUHMANN-WENNHOLD:
Adrenal-in vivo.
In: Methods in Investigate and
Diagnostic Endocrinology. Vol. 2 A.
Eds.: S.A.Berson and R.S.Yalow
North-Holland Publishing Company -
Amsterdam-London; American Elsevier
Publishing Company, Inc.- New York
(1973), p. 336.
54. NELSON, D.H., H.MATSUYAMA and A.RUHMANN-WENNHOLD:
Adrenal vein steroids.
In: Methods in Investigate and
Diagnostic Endocrinology. Vol.2A.
Eds.: S.A.Berson and R.S.Yalow,
North-Holland Publishing Company -
Amsterdam-London; American Elsevier
Publishing Company, Inc. - New York
(1973), p. 367.
55. ORTH, D.N., W.E.NICHOLSON, W.M.MITCHELL, D.P.ISLAND
and G.W.LIDDLE:
Biologic and immunologic characteri-
sation and physical separation of
ACTH and ACTH fragments in the
ectopic ACTH syndrom.
J. clin. Invest. 52, 1756 (1973).
56. PALMIERI, G.M.A., R.S.YALOW and S.A.BERSON:
Adsorbent techniques for the separa-
tion of antibody-bound from free pep-
tide hormones in Radioimmunoassay.
Horm.Metab.Res. 3, 301 (1971).
57. PEARLMUTTER, A.F., E.RAPINO and M.SUFFRAN:
Comparison of steroidogenic effects
of cAMP and dbcAMP in the fat adrenal
gland.
Endocrinology 92, 679 (1973).
58. PFEIFFER, E.F., G.GARMENDIA, E.VAUBEL und K.RETIENE:
Exogene und endogene ACTH-Aktivitäten
im nativen Plasma des Menschen.
Erg.Inn.Med., N.F. 20, 127 (1963).
59. PINCUS, G., T.F.HOPKINS and O.HECHTER:
An ACTH-inactivating factor in mamma-
lian blood.
Arch. Biochem. 37, 408 (1952).
60. PISTER, W.:
Zur biologischen ACTH-Bestimmung an
der akut hypophysektomierten Ratte.
Dissertation, Universität München
(1973).

61. PURVES, H.D., and N.E.SIRETT:
The stability of endogenous and
exogenous corticotrophin in rat
plasma as established by a bioassay
in intact rats.
J. Endocr. 41, 491 (1968).
62. RATCLIFF, J.G. and C.R.W. EDWARDS:
The extraction of adrenocortico-
trophin and arginine-vasopressin from
human plasma by porous glass.
In: Radioimmunoassay Methods.
Eds.: K.E.Kirckham and W.M.Hunter,
Edinburgh, Churchill Livingstone
(1971), p. 502.
63. RATCLIFF, J.G., R.A.KNIGHT, G.M.BESSER, J.LANDON and
A.G.STANSFELD:
Tumour and plasma ACTH concentrations
in patients with and without the
ectopic ACTH syndrome.
Clin.Endocrin. 1, 27 (1972).
64. ROSSELIN, G., R.ASSAN, R.S.YALOW and S.A.BERSON:
Separation of antibody-bound peptide
hormones labelled with iodine-131 by
talcum powder and precipitated silica.
Nature 212, 355 (1966).
65. RUF, K.:
Bestimmungsmethoden für ACTH beim
Menschen.
Schweiz.Med.Wschr. 96, 684 (1966).
66. RUSCHEFSKY, H.:
Dissertation, Universität München.
In Vorbereitung.
67. SAYERS, G.:
Adrenocorticotrophin.
In: Hormones in Blood.
Eds.: C.H.Gray and A.I.Bacharach.
New York and London, Academic Press
(1961), p. 185.
68. SAYERS, G., R.L.SWALLOW and N.D.GIORDANO:
An improved technique for the prepara-
tion of isolated rat adrenal cells:
A sensitive, accurate and specific
method for the assay of ACTH.
Endocrinology 88, 1063 (1971).

69. SAYERS, G. and N.D.GIORDANO:
Adrenal ascorbic acid depletion and isolated rat adrenal cell methods.
In: Methods in Investigate and Diagnostic Endocrinology. Vol. 2 A. Eds.: S.A.Berson and R.S.Yalow, North-Holland Publishing Company - Amsterdam-London; American Elsevier Publishing Company, In. - New York (1973), p. 359.
70. SAYERS, G. and R.J.BEALL:
Isolated adrenal cells: Hypersensitivity to adrenocorticotrophic hormone after hypophysectomy.
Science 179, 1330 (1972).
71. SAYERS, M.A., G.SAYERS and L.A.WOODBURG:
The assay of adrenocorticotrophic hormone by the adrenal acid depletion method.
Endocrinology 42, 379 (1948).
72. SCHWANDT, P., P.WEISWEILER und R.LAMERZ:
Darstellung eines lipolytisch wirksamen Polypeptides (Peptid A) aus Hypophysen vom Schwein.
Z.ges.exp.Med. 155, 195 (1971).
73. SCHWANDT, P., M.KNEDEL und R.LINDLBAUER:
Experimentelle Untersuchungen zum Verfahren der in vitro Lipolyse.
Z.klin.Chem.u.klin.Biochem. 2, 81 (1968).
74. SCHWANDT, P.:
Die Lipotropine.
Klin.Wschr. 52, 153 (1974).
75. SCHWYZER, R., P.SCHILLER, S.SEELIG and G.SAYERS:
Isolated adrenal cells: Log dose response curves for steroidogenesis induced by ACTH₁₋₂₄, ACTH₁₋₁₀, ACTH₄₋₁₀ and ACTH₆₋₁₀.
FEBS Letters 19, 229 (1971).
76. SCRIBA, P.C., R.HACKER, P.DIETERLE, F.KLUGE, W.HOCHHÄUSER und K.SCHWARZ:
ACTH-Bestimmungen im Plasma aus dem Bulbus cranialis venae jugularis.
Klin.Wschr. 44, 1393 (1966).

77. SEELIG, S., G.SAYERS, R.SCHWYZER and P.SCHILLER:
Isolated adrenal cells:
ACTH₁₁₋₂₄, a competitive antagonist
of ACTH₁₋₃₉ and ACTH₁₋₁₀:
FEBS Letters 19, 232 (1971).
78. SEELIG, S., S.KUMAR and G.SAYERS:
Isolated adrenal cells: The
partial agonist [Trp(Nps)] ACTH₁₋₃₉
and [Trp(Nps)] ACTH₁₋₂₄:
Proc.Soc.exp.Biol.Med. 139, 1217 (1972).
79. SEELIG, S. and G.SAYERS:
Isolated adrenal cortex cells:
ACTH agonists, partial agonists,
antagonists; cyclic AMP and cortico-
sterone production.
Arch.Biochem.Biophys. 154, 230 (1973).
80. SIEGEL, L.M. and K.J.MONTY:
Determination of molecular weights
and frictional ratios of proteins in
impure systems by use of gel filtra-
tion and density gradient centrifug-
ation. Application to crude prepara-
tions of sulfite and hydroxylamine
reductases.
Biochim.Biophys.Acta 112, 346 (1966).
81. STAHLHEBER, H. und P.LEHNERT:
Verdauungsenzyme.
Kali-Chemie AG, Hannover (1971).
82. STAUB, J.J. and J.G.RATCLIFF:
Die ACTH-Bestimmung und ihre klinische
Anwendung.
Therapeut.Umschau 29, 523 (1972).
83. SWALLOW, R.L. and G.SAYERS:
A technic for the preparation of
isolated adrenal cells.
Proc.Soc.exp.Biol.Med. 131, 1 (1969).
84. SYDNOR, K.L. and G.SAYERS:
A technic for determination of adreno-
corticotrophin in blood.
Proc.Soc.exp.Biol.Med. 79, 432 (1952).
85. TAUNTON, O.D., J.ROTH and I.PASTAN:
Studies on the adrenocorticotrophic
hormone-activated adenyl cyclase of a
functional adrenal tumor.
J. Biol. Chem. 244, 247 (1968).

86. UPTON, G.V., D.R.HOLLINGWORTH, S.LANDE, A.B.LERNER and T.T.AMATRUDA:
Comparison of purified human and porcine ACTH in man.
J. Clin. Endocr. 30, 190 (1970).
87. VERNIKOS-DANELIS, J.:
Sensitivity of the adrenal corticosteron response to ACTH as a function of time after hypophysectomy.
Endocrinology 84, 1507 (1969).
88. VOIGT, K.H., H.L.FEHM and E.F.PFEIFFER:
Production of antibodies to ACTH for use in radioimmunoassay.
Horm.Metab.Res. 3, 313 (1971).
89. VOIGT, K.H., H.L.FEHM, R.RECK and E.F.PFEIFFER:
Spontaneous and stimulated secretion of Quso-extractable immunoassayable ACTH in man.
Klin.Wschr. 52, 516 (1974).
90. WERDER, K. von, K.SCHWARZ, und P.C.SCRIBA:
Serumproteinbindung von ACTH.
I. Untersuchungen mit Dextrangelfiltration und ^3H -ACTH.
Klin.Wschr. 46, 940 (1968).
91. WERDER, K. von, K.SCHWARZ und P.C.SCRIBA:
Serumproteinbindung von ACTH.
II. Untersuchungen mit Dichtegradientenzentrifugation und ^3H -ACTH.
Klin.Wschr. 46, 1028 (1968).
92. WERDER, K. von :
Serumproteinbindung von Adrenocorticotropin. Ein Beitrag zum Problem der Bestimmung von ACTH-Plasma-Spiegeln.
Dissertation, Universität München (1968).
93. WILLIAMS, W.L., D.ISLAND, R.A.A.OLDFIELD jr. and G.W.LIDDLE:
Blood corticotropin (ACTH) levels in Cushing's disease.
J. clin. Endocr. 21, 426 (1961).
94. WOLFSEN, A.R., H.B.McINTYRE and W.D.ODELL:
Adrenocorticotrophin measurement by competitive binding receptor assay.
J. clin. Endocr. 34, 684 (1972).

95. YALOW, R.S. and S.A.BERSON:
Topics on radioimmunoassay of
peptide hormones.
In: Protein and Polypeptide Hormones.
Ed.: M. Margoulies, Excerpt. Medica
Foundation, Internat. Congress Series 161,
Amsterdam-New York-London-Paris-Milan-
Tokyo-Buenos Aires (1968).
96. YALOW, R.S. and S.A.BERSON:
Plasma ACTH in man.
In: Radioimmunoassay, Hospital Medicine.
Publications Limited (1971).
97. YALOW, R.S. and S.A.BERSON:
Size heterogeneity of immunoreactive
human ACTH in plasma and in extracts
of pituitary glands and ACTH-produ-
cing thymoma.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 439 (1971).
98. YALOW, R.S.:
Heterogeneity of peptide hormones:
Its implications for radioimmunoassay.
Symposium on Radioimmunoassay and
Related Procedures in Clinical Medicine
and Research, Istanbul (1973).
99. YALOW, R.S. and S.A.BERSON:
Characteristics of "Big ACTH" in human
plasma and pituitary extracts.
J. clin. Endocr. Metab. 36, 415 (1973).
100. YALOW, R.S. and S.A.BERSON:
Radioimmunoassay.
In: Methods in Investigate and Diagnostic
Endocrinology. Vol. 2 A.
Eds.: S.A. Berson and R.S. Yalow,
North-Holland Publishing Company -
Amsterdam-London; American Elsevier
Publishing Company, Inc. - New York
(1973), p. 371.

Lebenslauf

Ich wurde am 17.4.1947 in Oberrohr/Günzkreis geboren.
Meine Eltern sind das Landwirtsehepaar Xaver Baur und Maria Baur, geb. Rebholz.

Nach dem Besuch der 8-klassigen Volksschule in Ursberg und der anschliessenden landwirtschaftlichen Lehre holte ich auf dem 2. Bildungsweg am Münchenkolleg das Abitur nach, das ich im Juni 1969 bestand. Im Wintersemester 1969/70 begann ich mit dem Medizinstudium an der Universität München. Hier legte ich nach dem 2. Semester die naturwissenschaftliche Vorprüfung und nach dem 5. Semester die ärztliche Vorprüfung ab.

Vom Herbst 1972 bis zum Frühjahr 1974 arbeitete ich im Labor für experimentelle Endokrinologie der II. Medizinischen Universitätsklinik München an dieser Dissertation.

Seit Oktober 1973 bin ich mit der wissenschaftlichen Assistentin Dr. med. Cordula Baur, geb. Filser, verheiratet.

